



Université de Montréal

**La néoglucogenèse rénale: un nouvel aspect dans la restriction  
de croissance intra-utérine chez le rat**

Par

Etienne Khoury

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales

Juin 2010

© Etienne Khoury, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La néoglucogenèse rénale: un nouvel aspect dans la restriction  
de croissance intra-utérine chez le rat**

Présenté par :

Etienne Khoury

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Lucie Parent : Présidente-rapporteuse

Dre Michèle Brochu : Directeur de recherche

Dr Réjean Couture : Membre du jury

## RÉSUMÉ

Bien que l'environnement intra-utérin défavorable soit associé à des conditions pathologiques à l'âge adulte, les mécanismes mis en place *in utero* ne sont pas encore élucidés. Nous avons établi un modèle de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) en donnant une diète faible en sodium à la rate pendant la dernière semaine de gestation. Ce modèle se caractérise par une diminution de perfusion placentaire et une redistribution du flot sanguin, favorisant l'irrigation des organes nobles (cœur et cerveau) au détriment du rein fœtal. De plus, l'expression rénale du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) est diminuée chez le fœtus. L'hypothèse de travail est que la néoglucogenèse hépatique et rénale augmente chez les fœtus RCIU afin de compenser la diminution de perfusion placentaire, et que l'expression rénale des récepteurs de VEGF (Flt-1 et Flk-1) est altérée à la suite de la redistribution du flot sanguin. Nos objectifs étaient de comparer l'expression protéique des enzymes de la néoglucogenèse et des récepteurs de VEGF entre les fœtus témoins et RCIU. L'aldolase B, la fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase augmentent dans les reins de fœtus RCIU par rapport aux témoins alors qu'aucun changement n'est observé dans le foie. De plus, l'expression de ces enzymes est différente selon le sexe du fœtus. Une diminution de Flt-1 est notée dans les reins de fœtus RCIU. Nos résultats démontrent que des adaptations surviennent chez le fœtus à la suite d'une insulte intra-utérine favorisant sa survie mais ayant des conséquences telles que la dysfonction rénale observée chez les adultes de ce modèle animal. À long terme, ces travaux pourront permettre d'entrevoir des avenues pour mieux identifier les approches de prévention lors de naissance à la suite d'une RCIU.



**Mots-clés:** Programmation fœtale, Métabolisme, Glucose, Facteur de croissance endothéliale vasculaire

## ABSTRACT

An adverse intrauterine environment is associated with several pathological conditions at adult age, however, the mechanisms underlying such a link remain to be elucidated. Feeding a low-sodium diet to dams during the last week of gestation consistently resulted in giving birth to intrauterine growth restriction (IUGR) offsprings. The present model is characterized by a reduced placental perfusion and a redistribution of a preferential blood flow to the brain and heart at the expense of the kidney. Moreover, renal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) is decreased in the IUGR fetuses. In this view, we hypothesize that the hepatic and renal gluconeogenesis is increased in the IUGR fetus in order to compensate the diminished placental perfusion, and the renal expression of VEGF receptors (Flt-1 and Flk-1) is altered in response to the redistribution of the blood flow. The specific aim of this study was to compare the protein expression of gluconeogenic enzymes and VEGF receptors between IUGR and control fetuses. Aldolase B, fructose-1,6- biphosphatase and glucose-6-phosphatase were significantly increased in the IUGR fetal kidneys compared to controls. However, gluconeogenic enzymes did not show any significant change in the IUGR liver. The fetal sex had an impact on the enzymes expression. A decreased expression of Flt-1 was also noted in the kidneys of the IUGR fetuses. Our results pointed out alterations in the fetal life that may be, in a way, essentiel for the survival of the fetus, but somehow, responsible for many pathological consequences at adult age, as the renal dysfunction observed in the present model. For the long term, this work may lead to many future perspectives helping to prevent several diseases, such as hypertension or diabetes for an IUGR case.

**Key words:** Fetal programming, Metabolism, Glucose, Vascular endothelial growth factor

## TABLES DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION DU MÉMOIRE	i
PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	iii
ABSTRACT AND KEY WORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii

**1. INTRODUCTION**

1.1 La grossesse	3
1.1.1 Modifications physiologiques chez la mère	3
1.1.2 Le Placenta	7
1.1.2.1 Transfert placentaire du glucose	11
1.2 Le métabolisme des glucides	13
1.3 La néoglucogenèse	15
1.3.1 Réactions enzymatiques pour la production du glucose	16
1.4 Le Rein	18
1.4.1 Fonctions principales et circulation rénale	18
1.4.2 Réabsorption rénale du glucose	20
1.4.3 Embryologie	22
1.5 Le Foie	24
1.5.1 Rôle du foie dans le métabolisme des glucides	24
1.5.2 Embryologie	26

1.6	Le modèle de restriction de croissance intra-utérine (RCIU)	29
1.7	Hypothèse et objectifs	35
<b>2.</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>37</b>
2.1	Animaux	38
2.2	Prélèvement des tissus	38
2.3	Immunobuvardage de type western	39
2.4	Analyse Statistique	40
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS</b>	<b>42</b>
3.1	Enzymes de la néoglucogénèse hépatique et rénale chez des fœtus témoins ou RCIU	43
3.2	Récepteurs du VEGF (Flt-1 et Flk-1) chez des fœtus témoins ou RCIU	48
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>50</b>
4.1	La Néoglucogénèse hépatique et rénale chez les fœtus RCIU	52
4.2	VEGF et récepteurs Flt-1 et Flk-1 lors d'une RCIU	58
4.3	Les limites expérimentales	59
4.4	Perspectives	61
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>64</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Les modifications hémodynamiques et hormonales au cours de la grossesse chez l'humain et le rat.	4
<b>Figure 2.</b>	La circulation utérine chez l'humain (A) et le rat (B).	6
<b>Figure 3.</b>	Vaisseaux utérins de rates (A) non gestantes et (B) gestantes (20 <sup>ème</sup> jour).	7
<b>Figure 4.</b>	Le développement du placenta.	8
<b>Figure 5.</b>	Régions principales et différents types cellulaires du placenta à terme.	10
<b>Figure 6.</b>	Les quatre phases de l'homéostasie du glucose chez l'humain à l'âge adulte.	14
<b>Figure 7.</b>	Voie de la néoglucogenèse (formation du glucose à partir du pyruvate).	17
<b>Figure 8.</b>	Structure macroscopique du rein.	20
<b>Figure 9.</b>	Réabsorption rénale du glucose.	21
<b>Figure 10.</b>	Le système vasculaire du rein fœtal.	23
<b>Figure 11.</b>	La Glycogénogenèse.	25
<b>Figure 12.</b>	Anatomie du foie.	28
<b>Figure 13.</b>	Expression du facteur de croissance endothelial vasculaire (VEGF) dans le rein de fœtus de rat de 22 jours.	33
<b>Figure 14.</b>	Expression protéique de la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C) dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.	44

<b>Figure 15.</b>	Expression protéique de l'aldolase B dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.	45
<b>Figure 16.</b>	Expression protéique de la fructose biphosphatase dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.	46
<b>Figure 17.</b>	Expression protéique de la glucose-6-phosphatase dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.	47
<b>Figure 18.</b>	Expression protéique des récepteurs de VEGF, Flt-1 (A) et Flk-1 (B) dans le rein de fœtus de rat de 22 jours.	49

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMP	:	Adenosine monophosphate
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	:	Adénosine triphosphate
BSA	:	Bovine sérum albumine, <i>Bovine Serum Albumine</i>
CO <sub>2</sub>	:	Dioxyde de carbone
CREB	:	Élément de réponse liant l'AMPc
CYTOC	:	Cytochrome C oxydase
DHET	:	Acide dihydroxyéicosatriénoïque
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétra acétique
EET	:	Acide époxyéicosatriénoïque
EGF	:	Facteur de croissance épidermique, <i>Epidermal Growth Factor</i>
(ERR) $\alpha$	:	Récepteur associé au récepteur des œstrogènes, <i>Estrogen Related Receptor alpha</i>
FBPase	:	Fructose biphosphatase
Flk-1	:	Récepteur du Facteur de croissance endothelial vasculaire 2
Flt-1	:	Récepteur du Facteur de croissance endothelial vasculaire 1
FOXO1	:	Facteur de transcription - <i>Forkhead box O1</i>
g	:	Gramme
g	:	Unité d'accélération
GDP	:	Guanosine diphosphate
GLUT	:	Transporteur de glucose
GTP	:	Guanosine triphosphate



G6Pase	:	Glucose-6-phosphatase
hCG	:	Hormone chorionique gonadotrope
HCl	:	Chlorure d'hydrogène
IGF	:	Facteur de croissance semblable à l'insuline, <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IGFBP	:	Protéine liante au Facteur de croissance semblable à l'insuline, <i>Insulin-like Growth Factor 1 Binding Protein</i>
IgG	:	Immunoglobulines G
KCl	:	Chlorure de potassium
KDa	:	Kilodaltons
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Dihydrogénophosphate de potassium
m	:	Masse
MAPK	:	Protéine kinase activée par des agents mitogènes
min	:	Minute
mM	:	Millimolaire
NaCl	:	Chlorure de sodium
NAD <sup>+</sup>	:	Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	:	Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide
Na/K ATPase	:	Pompe sodium/potassium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	Hydrogénophosphate de sodium (phosphate disodique)
NP-40	:	Phénoxy polyéthoxyléthanol nonyl
OAA	:	Oxaloacétate
Pb	:	Paire de bases azotées

PBS	:	Tampon phosphate salin
PCR	:	Amplification en chaîne par polymérase
PEP	:	Phosphoénolpyruvate
PEPCK	:	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEPCK-C	:	Phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique
PGC-1 $\alpha$	:	Récepteur alpha au facteur activé de prolifération des Peroxisomes, <i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha</i>
PKC	:	Protéine kinase C
qRT-PCR	:	Réaction de polymérase en chaîne précédée d'une transcription inverse en temps réel
RCIU	:	Restriction de croissance Intra-Utérine
SEM	:	Erreur type de la moyenne
SGLT	:	Cotransporteurs de glucose sodium dépendant, <i>Sodium-Glucose Linked Transporter</i>
sHE	:	Hydrolase de l'époxyde soluble
SIRT1	:	Sirtuine-1 (Homologue 2 du type silencieux de la régulation des informations)
SRAA	:	Système rénine-angiotensine-aldostérone
Trf	:	Transferrine
Tris	:	Trishydroxyméthylaminométhane
UDP	:	Uridine-diphosphate
v	:	Volume

VEGF	:	Facteur de croissance endothelial vasculaire, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
YY-1	:	Facteur de transcription yin-yang
°C	:	Degré Celsius

## REMERCIEMENTS

Tout d’abord, je tiens à remercier tous les membres de ma famille, qui ne cessent de croire en moi et qui étaient toujours à mes côtés, spécialement dans les moments les plus difficiles où l’espoir me manquait.

Un grand merci à Pascale qui était présente durant tous les événements de ma maîtrise. Que ce soit positif ou négatif, elle me montrait toujours le bon côté des choses ce qui me donnait une grande confiance en moi, me faisait croire à la réalisation de tout rêve et que rien n’est impossible.

Nicolas Boileau (1670) :

*Hâtez-vous lentement, et sans perdre courage,*

*Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage,*

*Polissez-le sans cesse, et le repolissez,*

*Ajoutez quelquefois, et souvent effacez.*

Un sincère remerciement à ma directrice de recherche, Dre Michèle Brochu, qui m’a toujours inspiré par des citations de la vie quotidienne, ayant un impact significatif ☺ sur ma façon d’apprendre, de penser et d’agir en réponse à toutes difficultés qui survient au travail. Sa patience, ses encouragements, ses conseils et son honnêteté m’ont permis de découvrir un potentiel de travail en moi que je ne croyais jamais posséder, ainsi qu’un esprit scientifique unique qui m’aidera amplement dans le cheminement gradué que je compte poursuivre dans les prochaines années .

Finalement, je remercie tous les collègues de laboratoire, en débutant par Véronique Houde, pour ses conseils techniques et théoriques, Benoit Sicotte, pour son aide à bien maîtriser mon projet de recherche et Sarah Monfils, pour son humour et sa tranquillité d'esprit. Sans oublier les membres du laboratoire de Dr. St-Louis, Mylène Provencher et Leslie Hausermann, qui ont fait de cet environnement un excellent lieu de travail et qui incitent à toujours repousser les limites.

## 1. INTRODUCTION

L'hypertension, le diabète de type 2 et l'obésité sont des conditions pathologiques qui surviennent en prenant de l'âge. Ces maladies sont souvent associées à des prédispositions génétiques et à des facteurs de risque liés au style de vie tels qu'une mauvaise nutrition (riche en lipides, pauvre en vitamines), des excès d'alcool, de tabac et autres (Armitage, et al. 2005; Cottrell and Ozanne 2008). Cependant, depuis plusieurs années, suite aux travaux du professeur Barker (Barker 1997), plusieurs études épidémiologiques ont clairement établi un lien entre un environnement défavorable *in utero* et l'apparition à long terme de ces maladies chroniques (Fowden 2006). Par exemple, il a été démontré qu'une diminution de la filtration glomérulaire et du nombre de néphrons durant la vie fœtale est associée à une augmentation de la pression sanguine (hypertension) à l'âge adulte (Ojeda, et al. 2008). Dans le modèle animal de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) utilisé au laboratoire, une dysfonction rénale a été démontrée chez la progéniture adulte (Battista, et al. 2002).

Au sein de la population canadienne, on estime que l'incidence de la RCIU, qui peut être considérée comme un indice d'environnement défavorable, est de 5 à 10 % (Girard 2007). Il est essentiel de déterminer les processus adaptatifs qui se mettent en place chez le fœtus dont la croissance est compromise, puisqu'ils sont susceptibles d'entraîner des effets néfastes à long terme. Le rein étant impliqué dans le développement de l'hypertension (Dotsch and Plank 2009), notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes intracellulaires rénaux chez le fœtus lors d'une RCIU. Cela permettra éventuellement d'identifier des cibles d'intervention afin de prévenir les maladies chroniques survenant à l'âge adulte.

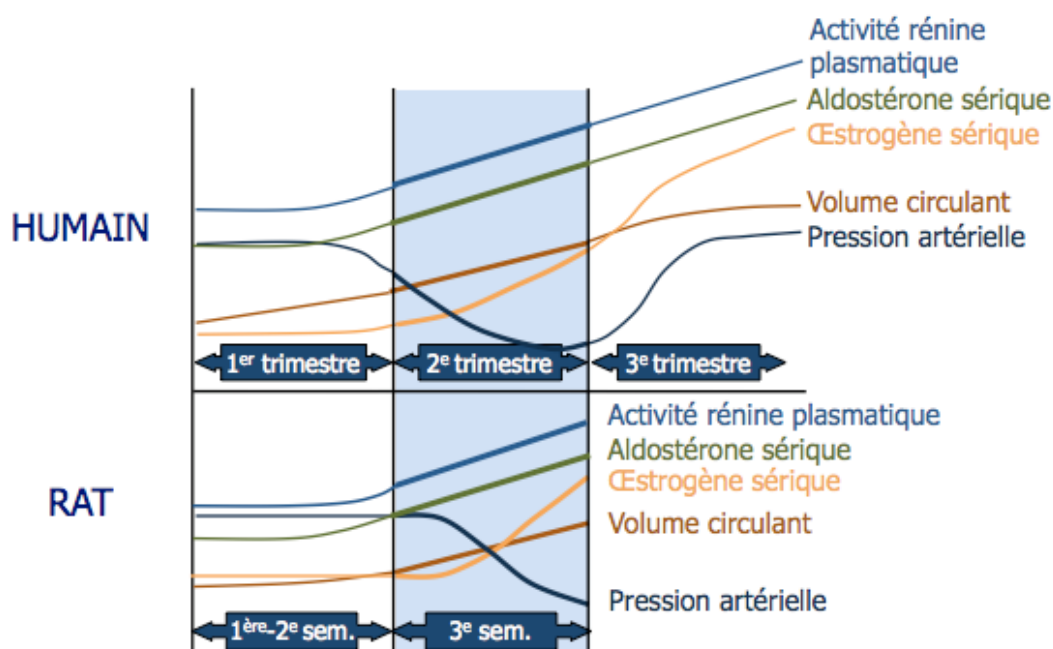
## **1.1 LA GROSSESSE**

### **1.1.1 Modifications physiologiques chez la mère**

Chez la femme, la grossesse dure environ 40 semaines alors que la période de gestation chez la rate est de 23 jours. Dès le premier trimestre, de nombreuses modifications physiologiques, hémodynamiques et hormonales s'installent chez l'humain. Les sécrétions de progestérone et d'œstrogène s'accroissent graduellement afin de mieux supporter l'implantation de l'embryon (Longo 1983). Le système rénine-angiotensine-aldostérone est stimulé et le pic de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) apparaît vers la dixième semaine (Cox, et al. 1996).

Plusieurs changements cardio-vasculaires maternels surviennent lors de la grossesse. Le volume circulant est augmenté d'environ 40 %, le débit cardiaque est accéléré, la résistance périphérique diminue et la pression artérielle baisse (Moutquin, et al. 1982). Ces modifications hormonales et cardiovasculaires, qui se situent autour du deuxième trimestre de grossesse chez la femme, sont en parallèle avec celles de la troisième semaine de gestation chez la rate (Fig.1).





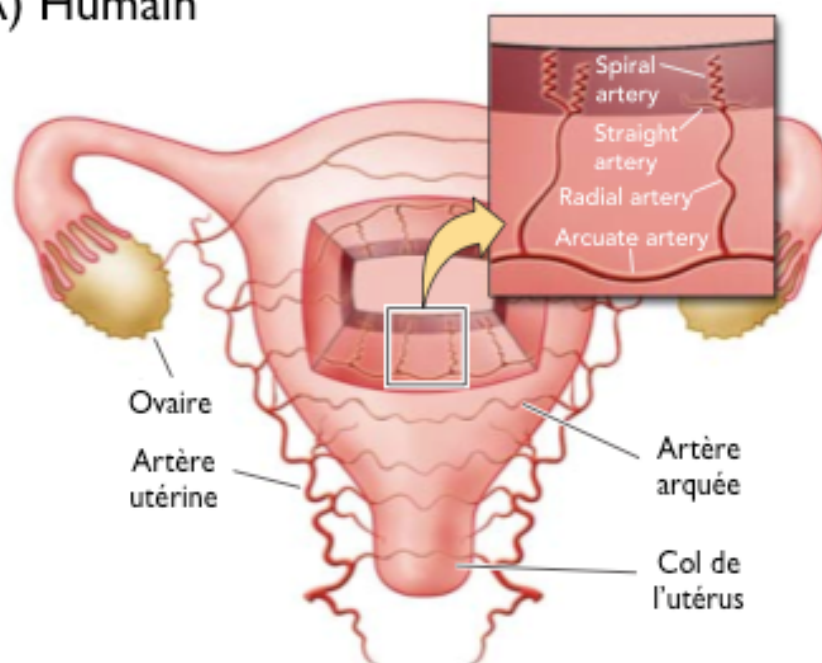
**Figure 1.** Les modifications hémodynamiques et hormonales au cours de la grossesse chez l'humain et le rat.

Durant la grossesse humaine, la circulation sanguine utérine est augmentée graduellement et de façon linéaire jusqu'à l'accouchement (Torgersen and Curran 2006). Chez la rate, le flot sanguin utérin s'accroît à partir du 15<sup>e</sup> jour de gestation, soit au début de la dernière semaine de gestation (Dowell and Kauer 1997). Bien qu'il y ait des similitudes entre le rat et l'humain en ce qui a trait aux changements cardiovasculaires et hormonaux, la circulation utérine est quelque peu différente. Ainsi, chez l'humain, la circulation sanguine émerge dans l'artère utérine à partir de l'artère iliaque pour atteindre la base de l'utérus. Une deuxième voie artérielle provenant de l'aorte abdominale, par laquelle s'allonge l'artère ovarienne, se lie aux ovaires d'un côté et à l'artère utérine de l'autre extrémité. L'artère utérine forme un réseau de vaisseaux qui

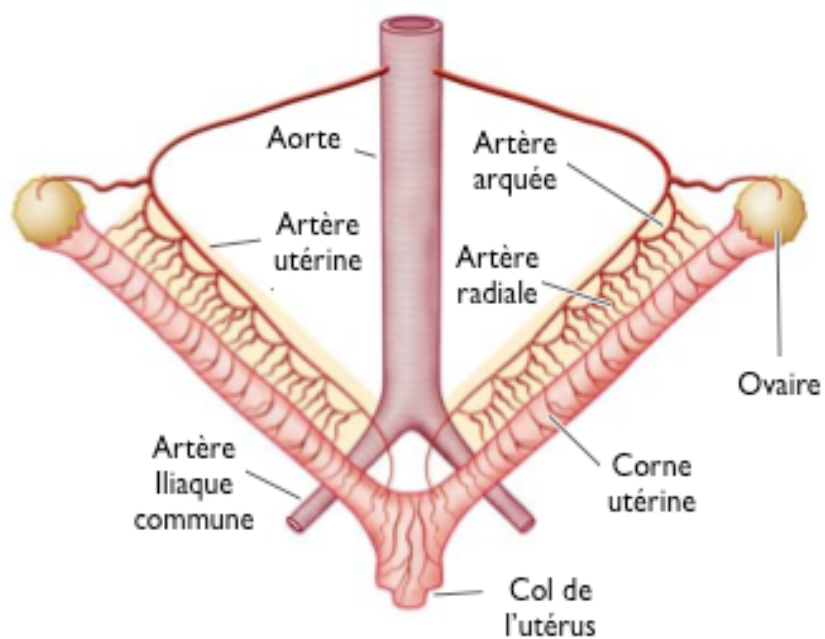
couvre l'utérus et pénètre dans les parois à partir des artères arquées. Ces dernières se prolongent en artères radiales qui atteignent l'endomètre et se subdivisent en artères spiralées (Fig. 2A) (Osol and Mandala 2009). Lors de la grossesse, ces vaisseaux vont atteindre le placenta et assurer une source de sang essentielle pour les échanges fœto-maternels.

Chez la rate, l'utérus est bicorne et constitué d'artères et de veines utéro-ovariennes alignées en parallèle. Les vaisseaux sanguins sont divisés en artères principales, arquées et radiales, et sont associés à l'extérieur de la paroi utérine (Fig. 2B) (Osol and Mandala 2009).

### A) Humain



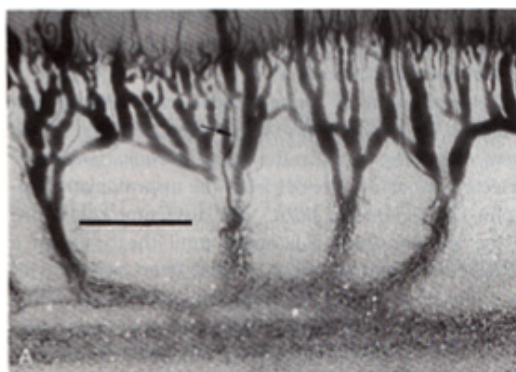
### B) Rongeur



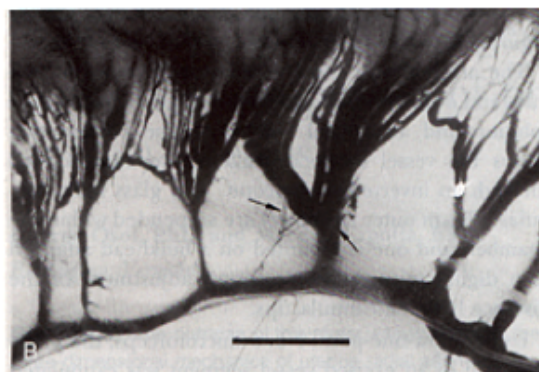
**Figure 2.** La circulation utérine chez l'humain (A) et le rat (B) (adapté de Osol and Mandala 2009).

La circulation utérine subit des changements apparents pendant la grossesse. Chez la femme, le diamètre des artères utérines principales doublent à la 21<sup>e</sup> semaine et la vélocité sanguine est presque quadruplée vers la 36<sup>e</sup> semaine (Palmer, et al. 1992). Des études chez le rat ont aussi démontré que le diamètre des artères utérines durant la dernière semaine de gestation augmente de deux à trois fois (Fig. 3).

**A) Non gestante**



**B) Gestante**



**Figure 3.** Vaisseaux utérins de rates (A) non gestantes et (B) gestantes (20<sup>ème</sup> jour).

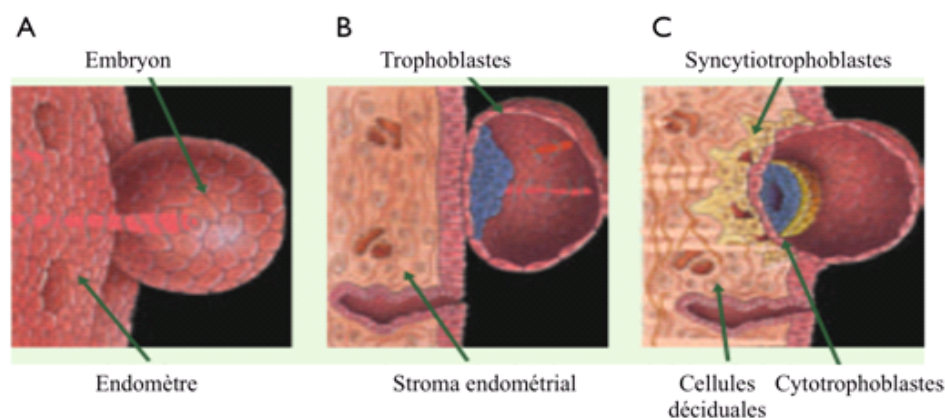
Les traits représentent l'échelle utilisée : A) 0.2 cm (5X) et B) 1 cm (1X) (adapté de Osol and Cipolla 1993).

### 1.1.2 Le placenta

Chez les mammifères, le déterminant majeur de la croissance intra-utérine est le transfert placentaire des nutriments vers le fœtus. Le placenta est une annexe embryonnaire qui forme une interface entre la circulation sanguine de l'embryon et la muqueuse utérine de la mère. Chez l'humain, au début de la grossesse, le blastocyste est situé au niveau du stroma de l'endomètre. À la suite de plusieurs mitoses, le trophoblaste se différencie en deux parois distinctes qui constituent le placenta : la

paroi proliférative interne, le cytotrophoblaste, et la paroi externe, le syncytiotrophoblaste (Fig. 4) (Tortora 1999).

Les échanges foëto-maternels impliquent une panoplie de molécules qui incluent des nutriments, des cytokines et des facteurs de croissance (tels qu'EGF: *Epidermal growth factor*, IGF-1: *Insulin-like growth factor*, etc.) qui favorisent le développement foëtal. Ces échanges nutritionnels se font de la circulation utérine maternelle vers le foetus par diffusion passive ou par des canaux et transporteurs spécifiques (Clarson, et al. 1997). Ces derniers sont localisés sur les membranes apicales (côté maternel) et basolatérales (côté foëtal) des syncytiotrophoblastes (Cramer, et al. 2002). Ces cellules forment une barrière hématoplacentaire qui sépare le sang maternel du sang foëtal tout en promouvant les échanges de substances entre la mère et le foetus. Toutefois, ce procédé dépend de la taille et de la morphologie du placenta ainsi que de l'abondance de ses transporteurs.

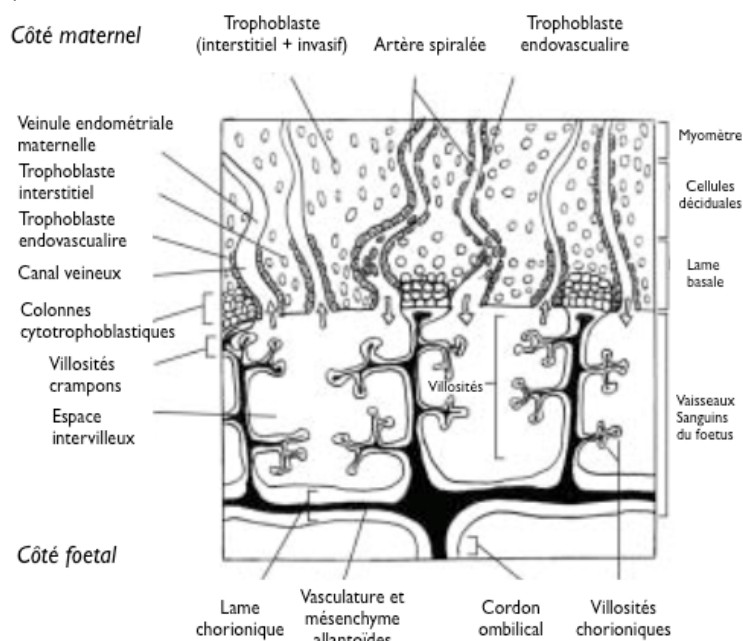


**Figure 4.** Le développement du placenta.

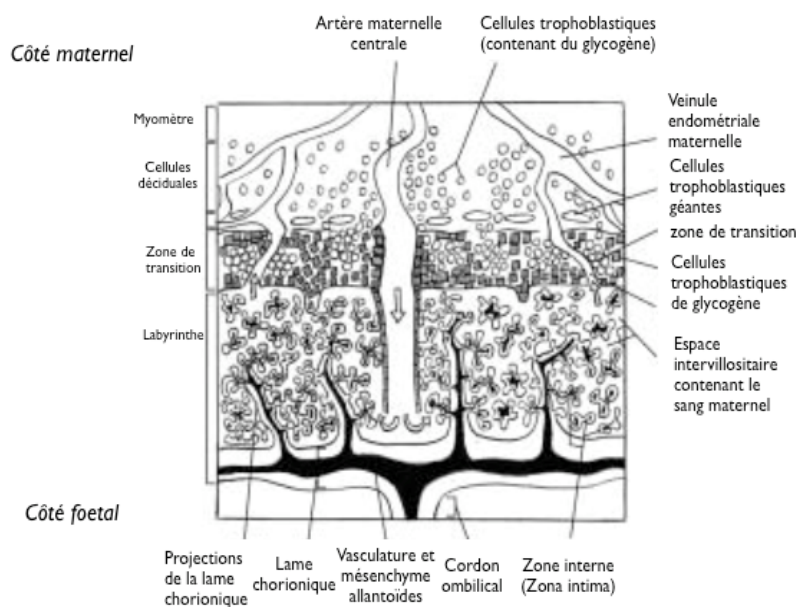
A) et B) Vue externe et interne de la zone de contact entre l'embryon et l'endomètre et C) Organisation des cytotrophoblastes et des syncytiotrophoblastes pour former la barrière placentaire (modifiée de Vidricaire et Tremblay 2004).

La morphologie du placenta chez les muridés (souris et rat) possède de grandes similitudes avec celle du placenta humain. Pour ces raisons, on peut qualifier le rat de bon modèle animal pour l'étude de l'environnement fœto-maternel (Georgiades, et al. 2002). Le placenta murin, formé par le chorion embryonnaire d'un côté et la couche basale de l'endomètre de l'autre, se divise en plusieurs régions. Le labyrinthe chez le rat (nommé placenta fœtal chez l'humain) contient les vaisseaux sanguins qu'emprunte la circulation utéro-placentaire entre la mère et le fœtus. La zone de transition, une région périphérique du côté maternel, (nommée lame basale ou site d'implantation chez l'humain) est constituée uniquement des vaisseaux sanguins à partir desquels le flot sanguin de la mère pénètre dans le labyrinthe (placenta fœtal). Finalement, la région de l'utérus où se situe la zone des cellules trophoblastiques subit des invasions très importantes pour la fonction placentaire autant chez l'humain que le rat (Fig. 5) (Georgiades et al. 2002).

## A) HUMAIN



## B) SOURIS



**Figure 5.** Régions principales et différents types cellulaires du placenta à terme.

Placenta A) de l'humain et B) des muridés (rat ou souris) durant le troisième trimestre et la dernière semaine de gestation (adapté de Georgiades et al. 2002).

L'unité fœto-placentaire se forme à partir de deux mécanismes distincts. La vasculogénèse permet la formation *de novo* des vaisseaux sanguins à partir des hémangioblastes (cellules précurseurs des cellules endothéliales) et l'angiogénèse assure la croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants et est contrôlée principalement par le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF; *vascular endothelial growth factor*) et ses récepteurs tyrosine kinase Flt-1 (VEGF-R1) et Flk-1 (VEGF-R2) (Claesson-Welsh 2003; Ferrara, et al. 2003; Lenton 2002; Tufro, et al. 1999).

Le placenta assure, en général, la transmission des anticorps maternels, la production d'hormones (la progestérone, les œstrogènes et la  $\beta$ -hCG), la détoxification de certaines drogues et l'échange fœto-maternel des nutriments, des électrolytes et des facteurs de croissance pour répondre adéquatement aux besoins du fœtus (Garnica and Chan 1996). Cependant, parmi tous les nutriments échangés, le transport du glucose constitue un élément essentiel pour la nutrition et le métabolisme énergétique du fœtus (Nordlie, et al. 1999).

#### 1.1.2.1 Transfert placentaire du glucose

Le glucose est le substrat énergétique primaire qui assure un métabolisme normal et une croissance adéquate du fœtus. Le placenta consomme une partie du glucose extrait de la circulation maternelle et le fœtus dépend du transport net du glucose à travers le placenta (Ericsson, et al. 2005). Ce monosaccharide polaire est totalement insoluble en phase lipidique et ne peut donc pas traverser la barrière hématoplacentaire par diffusion passive. Le transfert placentaire du glucose est effectué par diffusion facilitée suivant le gradient de concentration à l'aide de transporteurs



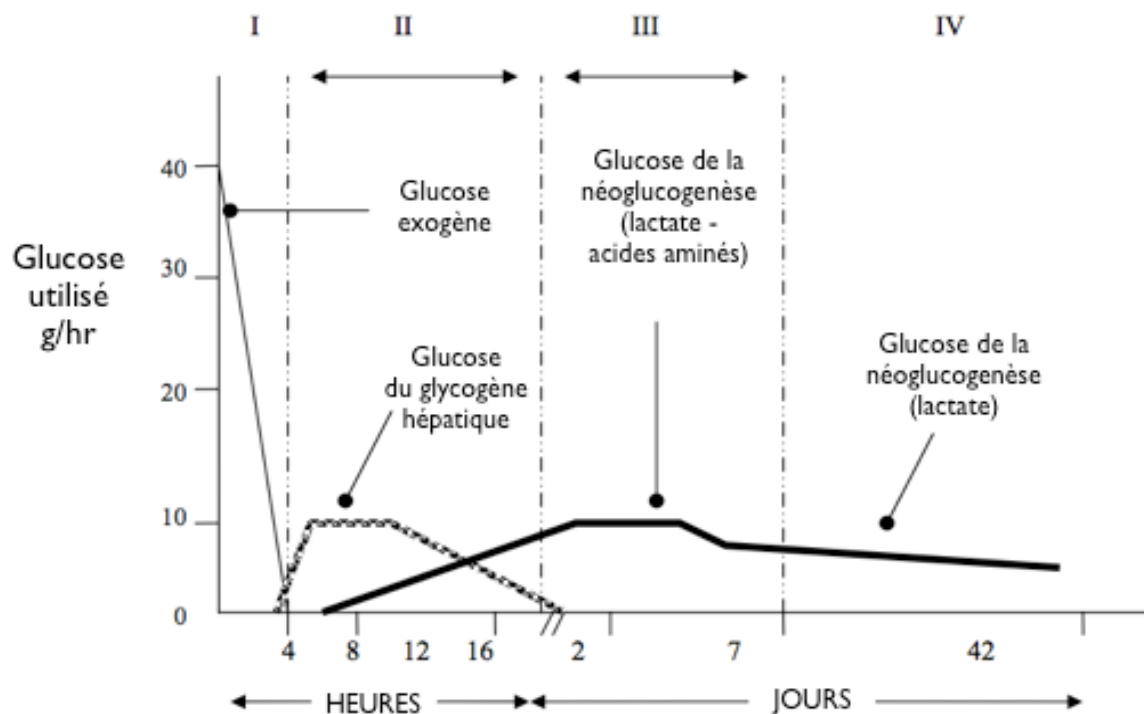
membranaires situés au niveau des cellules du syncytiotrophoblaste (Takata, et al. 1994). Seulement deux des douzes isoformes des transporteurs de glucose ont été identifiés au niveau du placenta: les transporteurs de glucose 1 et 3 (GLUT1 et GLUT3) (Wooding, et al. 2005). GLUT 1 est localisé au niveau de la couche du syncytiotrophoblaste (côté maternel) et assure l'apport du glucose de la circulation sanguine vers le placenta. GLUT 3, qui se trouve sur la membrane plasmique des cellules du syncytiotrophoblaste (côté maternel et fœtal), est responsable du transport du glucose vers le sang fœtal (Takata et al. 1994). Il existe également un autre type de transport de glucose au niveau du placenta, le co-transporteur de glucose dépendant du sodium (SGLT1: *Sodium-Glucose Transporter*). Cette glycoprotéine transmembranaire fonctionne en suivant le gradient électrochimique de l'ion sodium maintenu par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate) (Kevorkova, et al. 2007; Takata and Hirano 1997).

Il a été démontré que la production de glucose chez le fœtus demeure négligeable au début de grossesse chez l'humain ou durant les deux premières semaines de gestation chez le rat (Hay, et al. 1981; Herrera, et al. 1994). Cela peut s'expliquer par le transfert placentaire de glucose et d'autres nutriments qui proviennent essentiellement de la mère. Toutefois, plusieurs adaptations doivent se mettre en place pour compenser l'apport nutritionnel de substrat et d'énergie d'origine maternel qui est supprimé subitement à la naissance. Des études ont démontré chez les fœtus de rat en fin de gestation une augmentation significative des activités de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase), des enzymes de néoglucogenèse, dans le foie et le cortex rénal (Fowden, et

al. 1993). Cela suggère que la néoglucogenèse chez le fœtus de rat débute à partir de la dernière semaine de gestation probablement pour préparer le fœtus au mode de vie extra-utérin et éviter les risques d'hypoglycémie.

## **1.2 LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES**

En général, le foie est le principal producteur de glucose. Cet organe possède la plupart des réserves corporelles de glycogène qui peuvent être mobilisées pour maintenir la glycémie via la glycogénolyse (dégradation de glycogène) (Nordlie et al. 1999; Petersen, et al. 1996). Normalement, chez un adulte, le glucose utilisé provient de la nourriture mais lorsque l'apport nutritionnel n'est pas suffisant, par exemple en post-digestif, la glycogénolyse survient. Lors d'un jeûne, la néoglucogenèse hépatique ou rénale sera activée afin de produire du glucose à partir du lactate, du glycérol et des acides aminés, tel que décrit dans la figure 6 ci-dessous.



État Nutritionnel	Normal (0-4 hrs)	Post-digestif (4-24 hrs)	Début jeûne (1-8 j)	Jeûne prolongé (8-40 j)
Origine du glucose sanguin	Exogène	Glycogène hépatique, néoglucogenèse	Néoglucogenèse hépatique et rénale	Néoglucogenèse hépatique et rénale
Les tissus qui utilisent le glucose	Tous	Tous excepté le foie. Petite quantité de glucose utilisé par les muscles squelettiques et tissus adipeux	Cerveau - Rein. Petite quantité de glucose utilisé par les muscles squelettiques	Niveau atténué de glucose utilisé par le cerveau.
Source principale d'énergie pour le cerveau	Glucose	Glucose	Glucose	Corps cétoniques

**Figure 6.** Les quatre phases de l'homéostasie du glucose chez l'humain à l'âge adulte (adapté de Joslin and Kahn 2005).

Normalement, le foie contribue pour 75% de la production totale de glucose alors que le rein couvre les autres 25% (Drury, et al. 1950; Gerich, et al. 2001). Chez l'humain comme chez l'animal, le cortex rénal participe significativement à la néoglucogenèse (Krebs and Yoshida 1963; Schoolwerth, et al. 1988). Toutefois, sa contribution varie selon les conditions physiologiques et pathologiques. Chez les animaux, le rein contribue en état post-digestif à 15-25 % de la production totale du glucose. Dix à vingt pour cent de ce glucose formé sera cependant utilisé pour les propres fins énergétiques du rein (Stumvoll, et al. 1997). Il a été démontré, à partir d'une mesure de l'équilibre artérioveineuse (mesurer le flot du glucose sanguin entre l'artère et la veine rénales par fluoroscopie) combinée à une technique de marquage (glucose exogène radiomarqué (D-[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] glucose)), qu'en hypoglycémie, la libération du glucose provenant de la néoglucogenèse rénale augmente significativement chez l'humain (Cersosimo, et al. 1999). Une étude semblable a évalué, lors de la transplantation du foie chez l'humain, le taux de production de glucose endogène par le rein. Les résultats ont démontré que le rein peut compenser jusqu'à 100% la production et la relâche de glucose normalement assurée par le foie afin de maintenir la glycémie (Battezzati, et al. 2002; Drury et al. 1950; Joseph, et al. 2000).

### **1.3 LA NÉOGLUCOGENÈSE**

La néoglucogenèse est une voie métabolique qui permet la biosynthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol, les acides aminés (glutamine, alanine) et des métabolites du cycle de Krebs

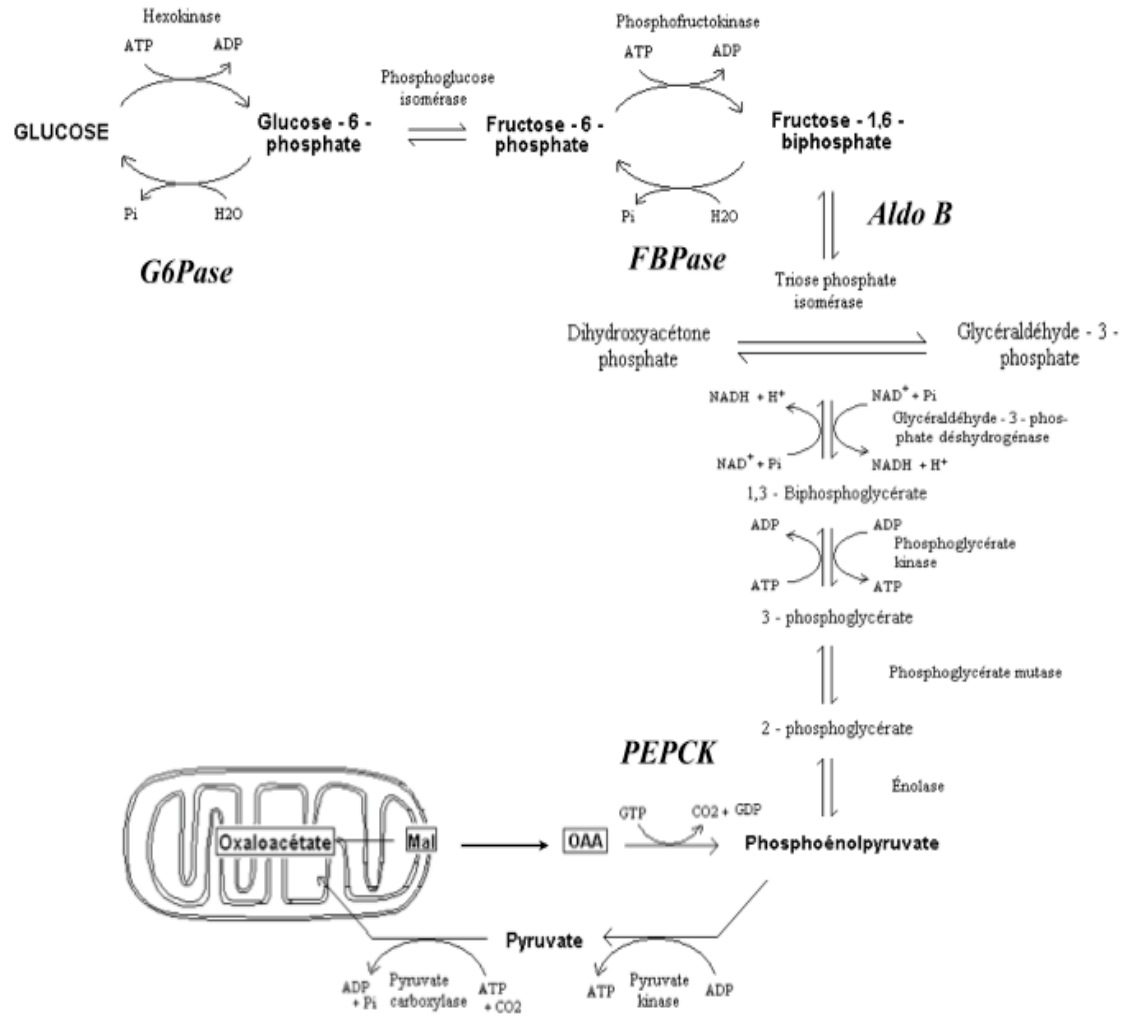
(Cherrington 1999; Nordlie et al. 1999). La néoglucogenèse est généralement sous le contrôle hormonal principal du glucagon et de l'insuline libérés par le pancréas. Cette glande sécrétoire est divisée en trois types cellulaires. On distingue les cellules alpha qui sécrètent le glucagon (20%), les cellules bêta, l'insuline (75%) et les cellules delta, la somatostatine (5%). Le glucagon active la production de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogenèse alors que l'insuline l'inhibe (Barthel and Schmoll 2003).

Contrairement à la glycolyse, la néoglucogenèse présente un bilan énergétique négatif avec une consommation d'énergie totale de 4 ATP (Fig. 7). Malgré cette dépense énergétique, le glucose formé servira à la production d'énergie par plusieurs voies métaboliques : la glycolyse (2 ATP) et le cycle de Krebs (2 ATP) suivis d'une phosphorylation oxydative mitochondriale (34 ATP). L'énergie générée sera donc utilisée pour permettre le métabolisme basal (contraction cardiaque, respiration, fonctionnement du cerveau, péristaltisme intestinal etc.) (Alberts, et al. 2007).

### **1.3.1 Réactions enzymatiques pour la production du glucose**

#### **1. Formation du phosphoénolpyruvate à partir de l'oxaloacétate**

La décarboxylation et la phosphorylation de l'oxaloacétate est contrôlée par l'activation de la PEPCK qui est une enzyme spécifique à la voie de la néoglucogenèse (Lalumière 2006). La forme cytosolique de PEPCK (PEPCK-C) qui se trouve dans les hépatocytes et les cellules des tubules rénaux est une enzyme limitante de la voie de la néoglucogenèse (Hanson and Reshef 1997; Rajas, et al. 2007).



**Figure 7.** Voie de la néoglucogenèse (formation du glucose à partir du pyruvate).

## 2. Formation du fructose-1,6-biphosphate à partir du phosphoénolpyruvate

L'aldolase existe sous trois isoformes avec différentes distributions tissulaires et cinétiques (Penhoet and Rutter 1975). L'aldolase A est plus abondante dans les muscles et les érythrocytes, l'aldolase B dans le foie, le rein et l'intestin grêle, et l'aldolase C dans le cerveau et les tissus neuronaux (Saez and Slebe 2000). Il a été démontré que

l'aldolase B est l'enzyme régulatrice qui participe de façon précise à la voie de la néoglucogenèse alors que l'aldolase A favorise la glycolyse (Yanez, et al. 2005).

### 3. Formation du glucose-6-phosphate à partir du fructose-1,6-biphosphate

L'enzyme fructose biphosphatase (FBPase) catalyse la conversion du fructose-1,6-biphosphate en fructose-6-phosphate de manière irréversible. Cette étape est suivie d'une réaction réversible catalysée par la phosphoglucose isomérase qui permet de substituer le composé fructose en glucose pour former le glucose-6-phosphate (Hung, et al. 2004; Kepka, et al. 2008).

### 4. Formation du glucose à partir du glucose-6-phosphate

La formation du glucose par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) est la dernière étape de la voie de la néoglucogenèse. Cette conversion irréversible est cruciale pour le maintien de la glycémie (Rajas et al. 2007).

## 1.4 LE REIN

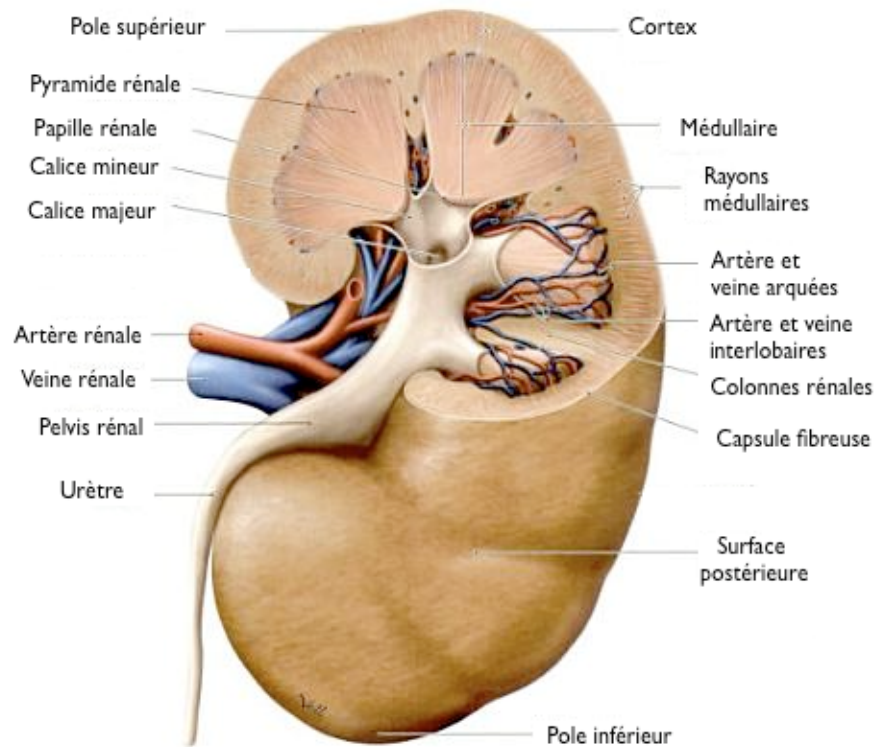
### 1.4.1 Fonctions principales et circulation rénale

Outre les fonctions de filtration du sang, l'homéostasie des liquides corporels et de ses constituants ainsi que de l'excrétion des substances organiques et des déchets, le rein a une fonction endocrinienne importante qui inclut la production du glucose tel que mentionné précédemment. L'unité fonctionnelle et structurale du rein est le néphron. Ce dernier participe aussi à la formation de l'urine à partir du glomérule dont la membrane filtre le plasma et retient les plus grosses molécules dans le sang. Les petits substrats forment le filtrat glomérulaire qui voyage le long du tubule rénal. Chaque

région de ce dernier est caractérisée par un système de réabsorption spécifique requérant différents transporteurs qui permettront de retourner vers les capillaires péri-tubulaires les électrolytes et les substrats nécessaires à l'homéostasie sanguine (Kriz and Kaissling 2000).

La circulation rénale est un facteur primordial dans la modification de la composition du plasma. Bien que le rein ne corresponde qu'à 0.5% du poids total du corps humain, ce dernier reçoit un débit sanguin total considérable de presque 20 % par rapport au cerveau (15 %) et au cœur (5 %) (Dworkin and Brenner 2004). La vasculature rénale est un système porte composé de deux réseaux capillaires : les capillaires glomérulaires suivis des capillaires péri-tubulaires (dans le cortex et la médullaire). Toutefois, il existe une distribution intrarénale du flot sanguin en prédominance corticale. Environ 90 % de la microcirculation capillaire émerge dans le cortex, et 10 % au niveau des *vasa recta* de la médullaire (Fig. 8) (Pallone, et al. 2003). Ceci est un indice d'une consommation d'oxygène et d'énergie métabolique beaucoup plus considérable au niveau des cellules rénales corticales que médullaires (pauvre en oxygène). La synthèse de l'ATP (énergie) dans le cortex rénal est nécessaire pour la réabsorption tubulaire active ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase), le potentiel membranaire et le volume cellulaire (Bertorello and Katz 1993). En clinique, on remarque que les patients avec une insuffisance cardiaque sévère présentent toujours une certaine insuffisance rénale. Ceci est une conséquence de la redistribution du débit sanguin irriguant les organes nobles (cœur, cerveau) au détriment du rein (Gougoux 2005).





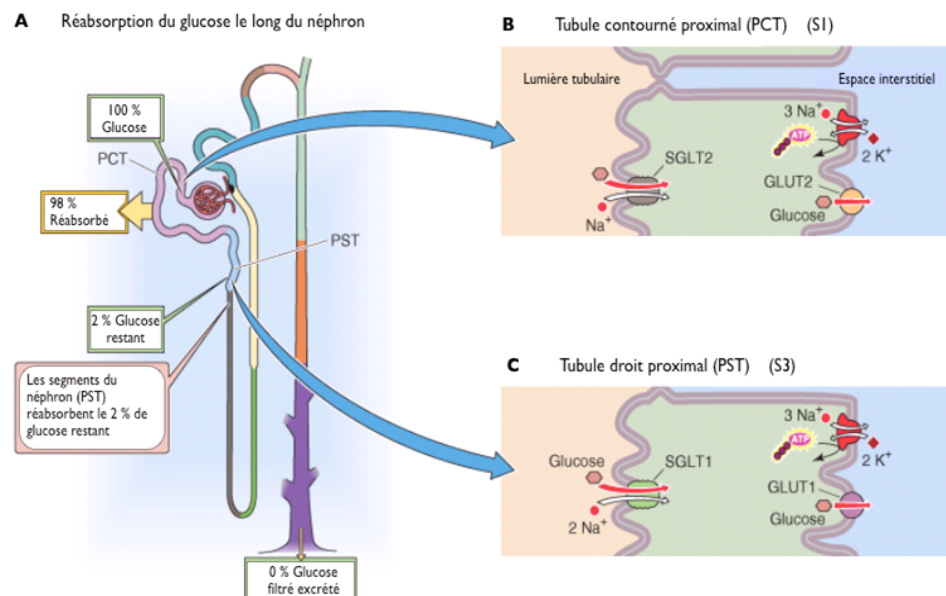
**Figure 8.** Structure macroscopique du rein.

Vue postérieure d'un rein droit avec la partie supérieure partiellement coupée (adapté de Schünke, et al. 2006).

#### 1.4.2. Réabsorption rénale du glucose

La filtration et la réabsorption du glucose sont essentielles pour le maintien de la glycémie sanguine. Le tubule rénal est formé d'un type unique de cellules épithéliales qui séparent la circulation sanguine de la lumière tubulaire. Les cellules tubulaires sont polarisées: une membrane apicale qui fait face à la lumière tubulaire, une membrane basolatérale qui borde les espaces latéraux intercellulaires et le liquide interstitiel qui lui-même est en contact avec la circulation sanguine (Matlin and Caplan

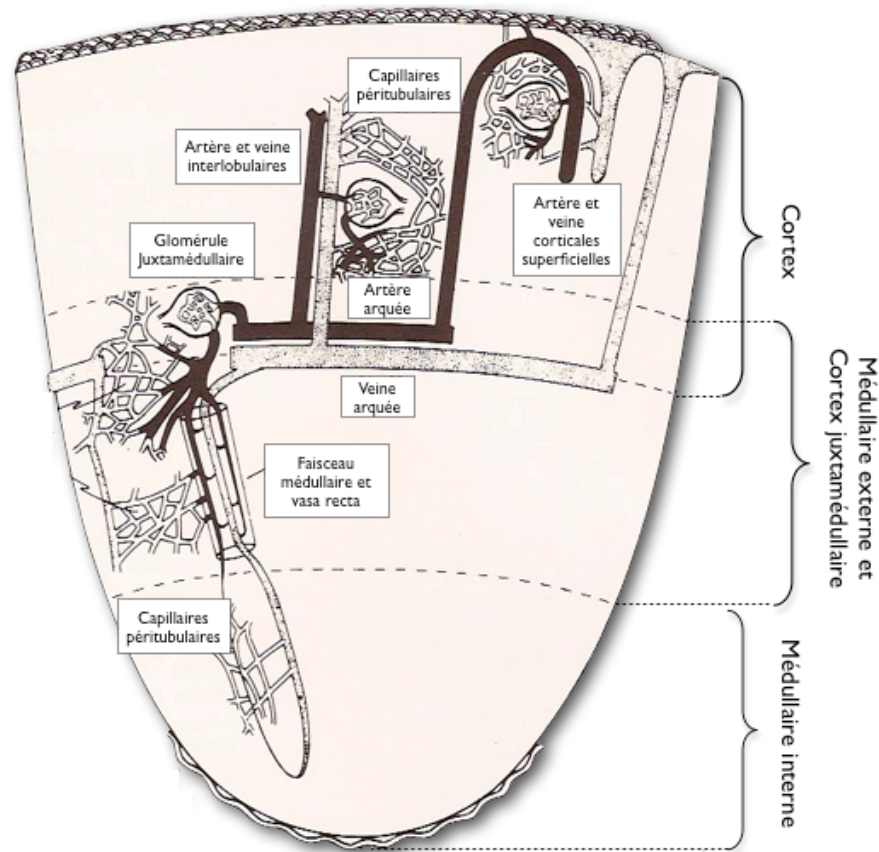
2000). Quatre-vingt-dix-huit pour cent du glucose est réabsorbé dans le tubule proximal cortical et 2 % dans la portion du tubule proximal comprise dans la médullaire externe (Fig. 9) (Lee and Han 2007) (Daniel and Rubio-Aliaga 2003). Cette réabsorption est complétée par quatre types de protéines de transport membranaire : deux co-transporteurs dépendant du sodium qui se situent sur la membrane apicale du tubule proximal et deux transporteurs facilités du côté basolatérale. Au niveau de la membrane apicale des sections S1 et S3 du tubule proximal se situent respectivement les co-transporteurs SGLT2 et SGLT1. Le glucose traverse ensuite la membrane basolatérale des cellules tubulaires vers le sang via les transporteurs facilités GLUT2 (dans le segment S1) et GLUT1 (dans le segment S3) (Silverman 2000). La réabsorption du glucose dépend du gradient électrochimique du sodium maintenu par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase au niveau de la membrane basolatérale (Fig. 9) (Hediger and Rhoads 1994; Wood and Trayhurn 2003)



**Figure 9.** Réabsorption rénale du glucose (adapté de Lee and Han 2007).

### 1.4.3 Embryologie

Durant la vie intra-utérine, on distingue trois stades de développement du rein fœtal : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Le pronéphros est rudimentaire et non fonctionnel, le mésonéphros est actif pendant la période précoce de la croissance fœtale, alors que le métanéphros forme le rein permanent. Ce troisième organe urinaire se développe durant la 5<sup>e</sup> semaine de la vie fœtale chez l'humain et au jour 12 chez le rat (Lechner and Dressler 1997). Durant cette période de développement, le système collecteur, les calices mineurs et majeurs, et le système excrétoire se forment. De plus, les artères rénales émergent à partir de l'aorte et passent à travers la veine cave inférieure mais le système de vascularisation rénal demeure partiellement fonctionnel. Les artères pénètrent le parenchyme rénal, se divisent en artères interlobulaires et s'associent aux colonnes rénales pour passer à travers les pyramides adjacentes. Cette angiogenèse promeut la construction d'un réseau de capillaires qui permet, à l'aide du VEGF et ses récepteurs Flt-1 (VEGFR1) et Flk-1 (VEGFR2), la vascularisation et assure le développement normal du rein fœtal (Fig. 10).



**Figure 10.** Le système vasculaire du rein fœtal (adapté de McCrory 1972).

Le VEGF est un facteur pro-angiogénique qui induit la prolifération cellulaire et augmente la perméabilité vasculaire (Ferrara et al. 2003). Sa fonction principale constitue la formation des capillaires et la prolifération de l'épithélium tubulaire rénal. L'activité biologique de VEGF est causée par l'abondance des récepteurs tyrosine kinase Flt-1, dont le rôle n'est pas tout à fait identifié, et Flk-1 qui agit au niveau du développement de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire (Takahashi and Shibuya 2005). Ces trois déterminants sont localisés au niveau du métanéphros, plus précisément dans les cellules épithéliales glomérulaires de rein fœtal (Simon, et al. 1995). Des études qui ont utilisé des cellules souches embryonnaires pour effectuer des

mutations totales des gènes cibles de VEGF et de ses récepteurs ont démontré que ces derniers sont cruciaux à la formation des vaisseaux sanguins chez l'embryon (Carmeliet, et al. 1996). Chez les fœtus de rat et de souris, l'absence de VEGF (VEGF<sup>-/-</sup>) provoque plusieurs altérations dans les structures vasculaires, avec un niveau de nécrose élevé dans les cellules tubulaires rénales. Ces animaux démontrent une diminution du nombre de glomérules avec une dysfonction rénale en post-natal. D'autre part, des mutations de Flk-1 causent des anomalies majeures dans la croissance des cellules endothéliales et les souris dont les gènes de Flt-1 sont mutés ne sont pas viables. Cela suggère que le VEGF et ses récepteurs sont des facteurs de survie essentiels pour le développement de nouveaux vaisseaux et jouent un rôle important dans la morphogenèse rénale (Ferrara et al. 2003).

Le rein atteint sa maturation vers le 18<sup>e</sup> jour après la naissance chez le rat alors que la néphrogenèse est complétée dès la 36<sup>e</sup> semaine de grossesse chez l'humain (McCrory 1972). La taille et la capacité fonctionnelle du rein sont associées à l'augmentation de la synthèse et de l'activité des enzymes cellulaires. Il a été démontré dans des cortex de reins fœtaux de rat que la G6Pase et la PEPCK étaient présentes au jour 21 de gestation et leurs activités augmentaient rapidement en post-natal suggérant une haute capacité de néoglucogenèse rénale dès la dernière semaine de gestation (Zorzoli, et al. 1969).

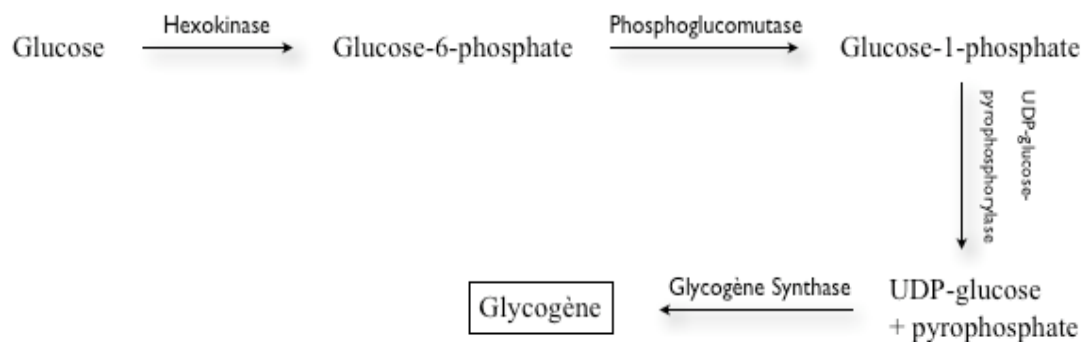
## **1.5 LE FOIE**

### **1.5.1 Rôle du foie dans le métabolisme des glucides**

Le foie est un réservoir de sang avec un flot lymphatique très élevé. Cet organe synthétise l'héparine anticoagulante et la plupart des protéines plasmatiques. L'une de

ses fonctions principales est l'élimination des substances toxiques qui seront à la suite déversées par la sécrétion biliaire. Par exemple, la dégradation des acides aminés en énergie crée des déchets toxiques qui seront convertis en urée (Gyamfi and Patel 2009).

Le foie joue aussi un rôle très important dans le métabolisme des glucides. Durant la phase digestive, les glucides sont hydrolysés en glucose, fructose et galactose, absorbés par les capillaires de l'intestin grêle et déversés dans la veine porte vers le foie. Ce dernier permet le stockage de grandes quantités de glucose sous forme de glycogène qui, lorsqu'en excès, sera déposé sous forme de gras dans le tissu adipeux. Tel qu'illustré à la figure 11, la glycogénogenèse (formation de glycogène à partir de glucose) est une suite de réactions enzymatiques telles que la formation de glucose-6-phosphate à partir de glucose sous le contrôle de l'hexokinase et la synthèse de glycogène à partir de l'uracil-diphosphate glucose (UDP-glucose) et du pyrophosphate via la glycogène synthase (Tortora 1999).



**Figure 11.** La Glycogénogenèse.

Donc, c'est le foie qui s'assure de façon continue du maintien de la glycémie dans la circulation sanguine par la glycogénolyse (dégradation du glycogène) et la néoglucogenèse (production de glucose).

### 1.5.2 Embryologie

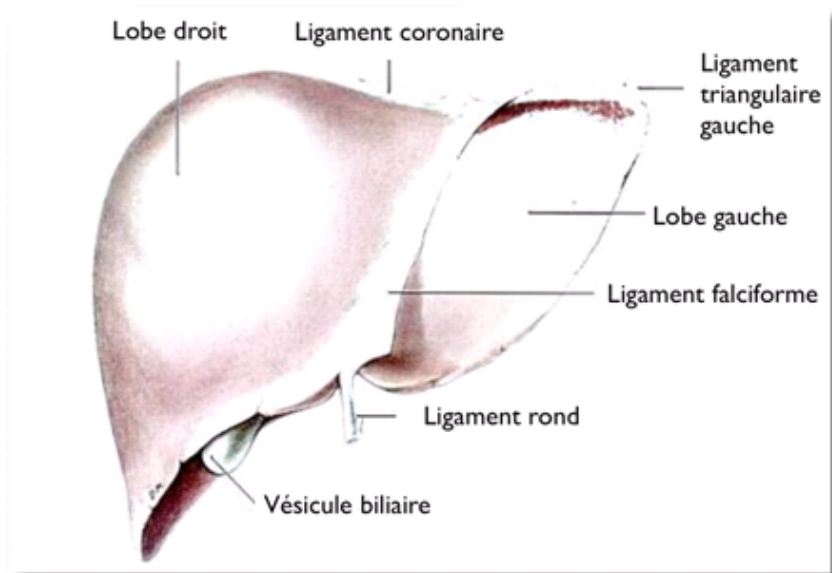
Chez l'humain, le foie apparaît dès la troisième semaine de gestation sous forme d'un épithélium de l'endoderme. Une série de divisions cellulaires suivies de différenciations forment le parenchyme hépatique (cellules du foie). À la dixième semaine, le poids du foie constitue presque 10% du poids total du fœtus. C'est durant la douzième semaine que les cellules hépatiques commencent à sécréter la bile et le foie est complètement fonctionnel à cette période de vie intra-utérine (Fig. 12) (Sadler 2006).

Chez le rat, les structures hépatiques et biliaires se développent entre les jours 15 et 23 de gestation. Durant la dernière semaine de gestation, des coupes histologiques et des reconstitutions graphiques chez le fœtus de rat ont démontré un élargissement considérable des vaisseaux sanguins et du foie. Au jour 17, le canal hépatique s'occlut, dû à de la prolifération endothéliale. Des jours 18 à 23, les lobules hépatiques, de forme cylindrique, sont formés d'un grand nombre de cellules hépatiques. Au centre de chacun, se trouve la veine intra-lobulaire dans laquelle les capillaires radiés se déversent. C'est entre ces capillaires que se retrouvent les cellules hépatiques réparties en deux colonnes et séparées par un canalicule de la voie biliaire (Godlewski, et al. 1997).

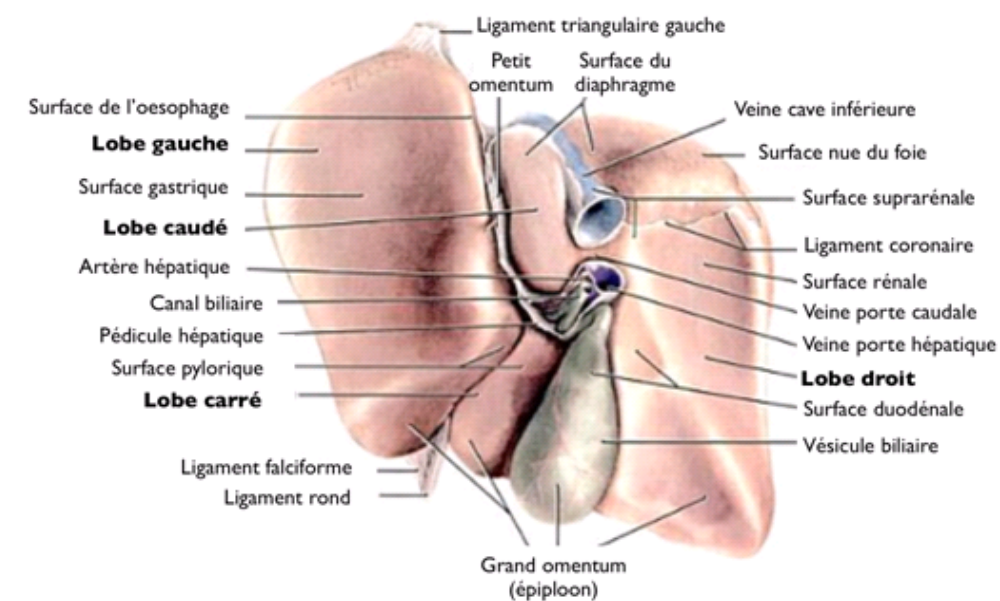
Toutes ces observations montrent une grande similitude dans les structures et les fonctions hépatiques humaines et murines qui fait du rat un bon modèle expérimental pour les études concernant le développement du foie.



### A) Vue antérieure



### B) Vue postéroinférieure



**Figure 12.** Anatomie du foie chez l'humain.

A) Vue antérieure et B) vue postéro-inférieure du foie (adapté de Agur and Dalley 2009).

## 1.6 LE MODÈLE DE RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTÉRINE

En tenant compte de la longévité et du style de vie de l'être humain, il demeure plus facile et pratique d'identifier des mécanismes moléculaires et cellulaires en utilisant le rat comme animal expérimental. Un meilleur contrôle des facteurs environnementaux (température, nourriture, lumière) avec une plus grande disponibilité des tissus et un temps de gestation plus court font du rat un bon outil de travail. Cela s'ajoute à plusieurs similarités qui existent entre le rat et l'humain, comme mentionné précédemment, au niveau des structures hépatiques, de la morphogenèse rénale et des mécanismes cellulaires mis en jeu.

Des études épidémiologiques et des travaux chez l'animal ont clairement démontré un lien entre des conditions inadéquates *in utero* et l'apparition à long terme de problèmes de santé (cardiovasculaire, endocrinien et métabolique) (Barker 2007; Thompson 2007). Souvent, le petit poids de naissance ou la RCIU sont considérés comme un indice de conditions intra-utérines néfastes. Plusieurs modèles animaux ont été créés pour mieux comprendre la programmation fœtale. Certaines équipes de recherche ont induit une diminution de perfusion placentaire à partir d'une ligature des artères utérines chez le cobaye, ce qui a mené à une restriction de croissance sévère avec une hypertension relative chez les nouveau-nés (Persson and Jansson 1992). D'autres groupes ont administré différentes compositions de diètes à des rates durant la dernière semaine de gestation (par exemple, diète faible en protéines, riche en glucides) et ont observé, par rapport aux témoins, une diminution du poids des fœtus ayant des pressions sanguines élevées à l'âge adulte (Franko, et al. 2009; Langley and Jackson 1994). La plupart de ces modèles animaux développent de l'hypertrophie cardiaque, de

la dysfonction rénale, de l'obésité ou même du diabète à l'âge adulte (Battista et al. 2002; Martin-Gronert and Ozanne 2007; Thompson 2007). Toutefois, il n'existe pas de modèles parfaits pour une RCIU mais chacun d'eux apporte des conclusions intéressantes conduisant à une meilleure compréhension des mécanismes qui se mettent en place chez le fœtus lors d'une insulte intra-utérine.

Au laboratoire, un modèle animal de RCIU a été créé en donnant une diète faible en sodium à la rate pendant la dernière semaine de gestation. Il a été développé de manière fortuite; le but étant d'étudier la régulation de l'aldostérone durant la gestation en induisant une diète faible en sodium. Cette méthode d'induction de la RCIU est non invasive comparativement à la ligature des artères utérines, d'où l'originalité du modèle.

La diète faible en sodium entraîne des diminutions du poids des fœtus et des placentas sans toutefois affecter le nombre de fœtus/portée par rapport aux rates gestantes témoins (Roy-Clavel, et al. 1999). Cependant, dans les modèles de restriction protéique, les fœtus ne sont pas toujours plus petits, bien que les conséquences à long terme (hypertension) soient présentes (Franko et al. 2009).

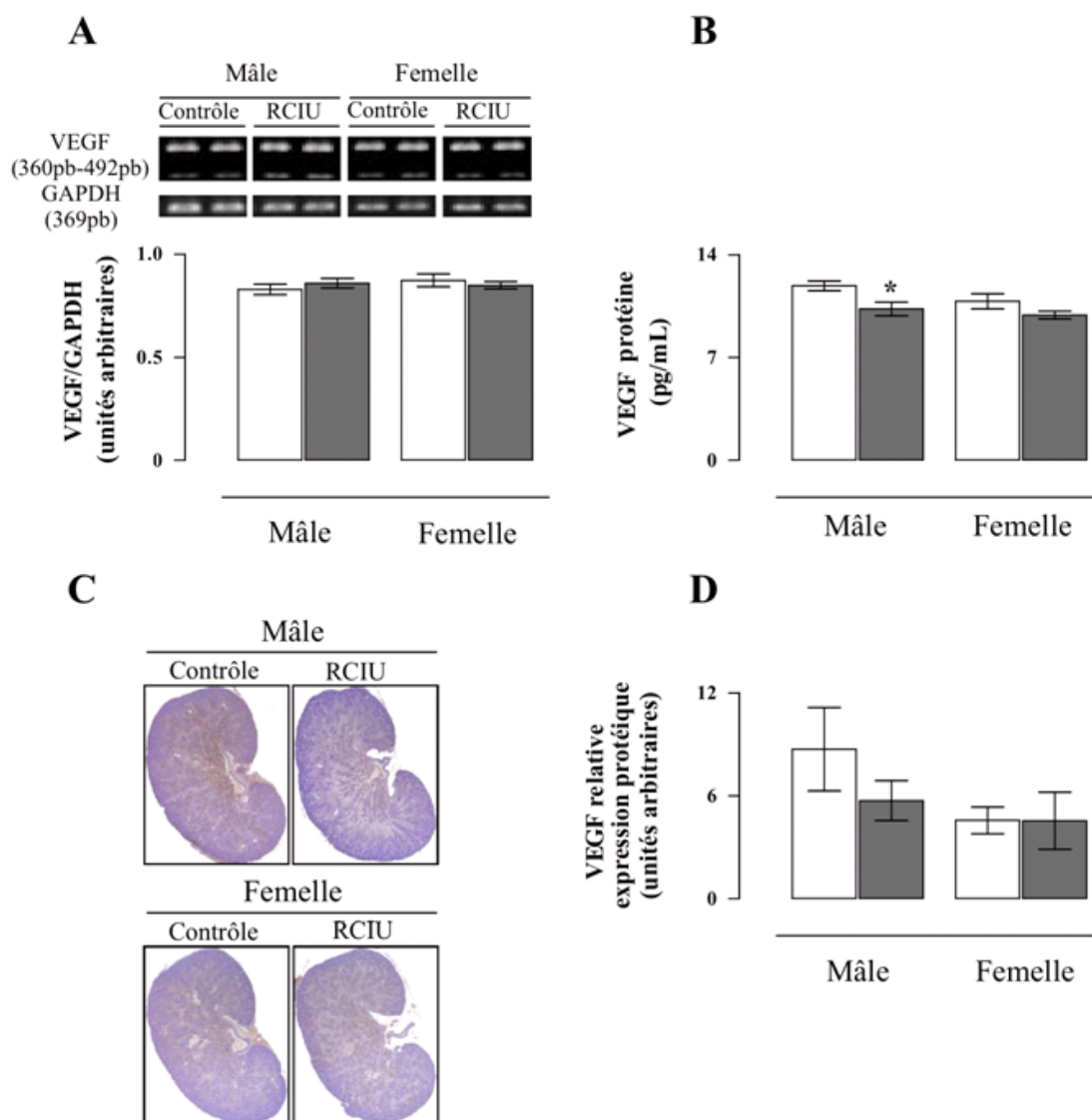
Chez le rat, une augmentation du débit sanguin utéro-placentaire est observée autour du jour 15 (Dowell and Kauer 1997). En réponse à cet effet, un remodelage des vaisseaux utérins, induit par le placenta ou le fœtus, s'installe au cours de la gestation (Osol and Mandala 2009). Dans notre modèle de rat, une baisse du volume plasmatique maternel est observée, empêchant l'expansion du volume sanguin maternel normalement observée au cours de la gestation (Roy-Clavel et al. 1999). Comparativement aux rates gestantes sous diète normale, le diamètre des artères

arquées utérines est aussi diminué (Bedard, et al. 2005; Scott, et al. 2009). Ces observations suggèrent fortement la présence d'une perfusion placentaire insuffisante.

Théoriquement, la RCIU est identifiée chez le fœtus qui n'atteint pas son plein potentiel de croissance. Le nouveau-né ne représente pas nécessairement des malformations ou une prématurité significative mais subit des anomalies physiologiques (petit poids, diminution du nombre de néphrons) et métaboliques (diminution du métabolisme des lipides) qui se développent *in utero*, d'où l'apparition de conditions pathologiques à l'âge adulte (Mullis and Tonella 2008). Chez l'humain, l'augmentation du volume circulant dans un cas de RCIU est plus faible qu'une grossesse normale et, dans cette condition, il existe une corrélation entre le poids du fœtus à la naissance et le volume circulant maternel (Duvekot, et al. 1995). Une insuffisance utéro-placentaire impose plusieurs adaptations fœtales, souvent hormonales, menant à des influences néfastes sur la croissance du fœtus. Également, une altération de la croissance somatique se manifeste avec une atteinte de la morphogenèse rénale, hépatique et vasculaire impliquant plusieurs modifications endocriniennes durant la vie fœtale (Platz and Newman 2008).

À la suite d'un débit sanguin utérin altéré, l'impact de la diète faible en sodium sur le volume circulant est probablement la cause majeure de la RCIU. Chez les fœtus RCIU du modèle utilisé, les ratios des poids du cœur et du cerveau par rapport au poids corporel sont augmentés, tandis que celui du rein demeure inchangé. Ceci est un indice d'une redistribution du débit cardiaque favorisant l'irrigation du cœur et du cerveau au détriment du rein.

Généralement, une malnutrition du fœtus ou une hypoxie, empêchant le foie et le rein de se développer normalement, induisent une RCIU qui cause plusieurs conséquences métaboliques à l'âge adulte (diabète de type 2) (Latini, et al. 2004). Notre laboratoire a démontré des altérations au niveau surrénalien dans les enzymes de la stéroïdogénèse (cytochrome P450 aldosterone synthase, cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase) favorisant la production de minéralocorticoïdes plutôt que des glucocorticoïdes ainsi qu'une augmentation de l'expression des enzymes catécholaminergiques et des gènes stimulés par l'hypoxie (Bibeau, et al. 2010). Karine Bibeau, étudiante dans le laboratoire, a voulu déterminer s'il y avait présence d'hypoxie au niveau du rein fœtal. Pour ce faire, elle a mesuré le facteur de croissance VEGF tel qu'illustré en figure 13. Nous nous sommes donc intéressés au rein où une diminution de perfusion a été suggérée. Le facteur de croissance VEGF a déjà été mesuré dans les reins de fœtus RCIU. L'expression génique de VEGF était inchangée dans les reins RCIU chez les mâles et les femelles, comparé à leurs témoins du même sexe (Fig. 13A). Par contre, l'expression protéique de VEGF diminue dans les reins de fœtus mâles RCIU par rapport à leur témoin (Fig. 13B, C, D). Le seuil significatif est cependant observé uniquement par la technique ELISA (Fig.13B). Le sexe n'a pas affecté de façon significative l'expression du VEGF dans le rein.



**Figure 13. Expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans le rein de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des groupes de 6 animaux de portées différentes et des groupes de 10 autres ont été formés afin d'évaluer l'expression génique (A) et protéique (B) de VEGF, respectivement. L'immunodétection de VEGF (C) a été effectuée sur des coupes de reins fœtaux de rat dans la paraffine et les images sont observées à un objectif optique de 2X. Des analyses semi-quantitatives sont effectuées pour l'immunodétection de VEGF (D). \*  $p < 0.05$  vs témoin du même sexe, test de Newman-Keuls.

Les animaux RCIU du modèle utilisé ont été étudiés jusqu'à 12 semaines (qui correspond à un jeune adulte, longévité du rat pouvant aller jusqu'à 2 ans). Ces animaux n'ont pas une condition pathologique mais ont développé des changements subtils tels que la dysfonction rénale (diminution de la filtration glomérulaire), le remodelage cardiaque hypertrophique chez les femelles et les altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) responsables de l'augmentation de la pression artérielle (Battista et al. 2002).

Comme mentionné précédemment, les études chez l'humain pouvant conduire à la compréhension des mécanismes se mettant en place *in utero* sont très difficiles à faire d'un point de vue longévité de l'humain et aussi d'un point de vue éthique. Notre modèle expérimental de rat est donc un outil adéquat pour mieux comprendre le système utero-placentaire et la programmation fœtale. Ce modèle présente plusieurs avantages par rapport à d'autres, concernant le poids fœtal qui est diminué de façon constante et le nombre de fœtus par portée qui demeure in affecté par la diète faible en sodium. Comparativement à d'autres modèles qui consistent en une diminution de la consommation de nourriture ou une diète faible en protéines, notre modèle représente une diminution de la perfusion placentaire qui entraîne une malnutrition du fœtus. Ceci ressemble particulièrement à une RCIU idiopathique chez l'humain, où on démontre l'absence de l'expansion volumique avec des bébés de plus petits poids (Salas, et al. 2006).

## 1.7 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS :

Une diète faible en sodium donnée à une rate gestante pendant la dernière semaine de gestation entraîne la naissance de fœtus avec une RCIU. Une diminution de la perfusion placentaire ainsi qu'une redistribution du flot sanguin au détriment du rein fœtal a été suggérée et on pense que cela aurait un effet néfaste sur le développement rénal ainsi que probablement sur sa vascularisation. Jusqu'à présent, il a été montré que l'expression protéique de VEGF est diminuée dans les reins de fœtus mâles RCIU. D'autre part, le glucose est la source d'énergie principale pour la croissance du fœtus et il est en demande surtout durant la dernière semaine de gestation chez le rat (Fowden, et al. 1992). Plusieurs études chez l'humain et le rat ont bien démontré que les fœtus RCIU sont plus susceptibles d'être atteints d'une hypoglycémie à la naissance (Coelho, et al. 2007; Gentili, et al. 2009). Bien que le foie soit l'organe essentiel pour la genèse du glucose, le rein contribue pour 25 % de la production totale et cette valeur augmente en cas de détresse hépatique.

Considérant toutes ces informations, nous émettons l'hypothèse que la néoglucogenèse hépatique et rénale augmente chez les fœtus RCIU afin de compenser la diminution de perfusion placentaire, et que l'expression rénale des récepteurs du VEGF (Flt-1 et Flk-1) est altérée à la suite de la redistribution du flot sanguin.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont de déterminer et de comparer entre des fœtus témoins et RCIU,

- 1- L'expression protéique des enzymes de la néoglucogenèse (PEPCK, Aldolase B, FB Pase et G6Pase) dans le rein et le foie;
- 2- L'expression protéique des récepteurs du VEGF, Flt-1 et Flk-1 dans le rein.



Ces travaux permettront une meilleure compréhension des modifications au niveau de la production de glucose et de l'expression des récepteurs rénaux du VEGF survenant chez des fœtus à la suite d'une diminution de perfusion placentaire.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

## **2.1 ANIMAUX**

Cette étude a été approuvée par le comité institutionnel de protection des animaux du centre de recherche du CHU Sainte-Justine accrédité par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Des rates Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) de 225-250 g ont été croisées avec des rats mâles fertiles. Le jour 1 de gestation a été déterminé par la présence de spermatozoïdes dans les frottis vaginaux. L'hébergement des animaux est sous environnement contrôlé, lumière de 6 AM – 6 PM et température pièce de  $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Les rates gestantes ont reçu l'une des deux diètes qui lui ont été assignées de façon aléatoire durant les 7 derniers jours de gestation (terme=23 jours). Le premier groupe a été nourri avec une diète normale contenant 0.2% de sodium et 0.40% de potassium (diète normale 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) avec de l'eau courante. Les fœtus de ces rates représentent le groupe témoin. Le second groupe a reçu une diète faible en sodium contenant 0.03% de sodium et 0.85% de potassium (diète faible en sodium 5881, PMI Feed Inc.) avec de l'eau déminéralisée. Les fœtus de ces rates naissent avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). La composition de la diète contrôle et expérimentale est similaire en protéines (19%), en glucides (60.6%) et en gras (10%).

## **2.2 PRÉLÈVEMENT DES TISSUS**

Au jour 22 de gestation, les animaux ont été sacrifiés (8 AM - 9 AM) par décapitation. Les reins et les foies fœtaux ont été prélevés rapidement et congelés dans

l'azote liquide. Ils ont été séparés selon le sexe du fœtus (3-4 reins/sexe/portée ont été mis ensemble et correspondent à n=1).

### **2.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN**

*Expression protéique de la Phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique, Aldolase B, Fructose-1,6-biphosphatase, Glucose-6-phosphatase, Flt-1 et Flk-1.*

Les foies et les reins de fœtus congelés (n=10 individus/groupe) ont été homogénéisés dans un tampon Tris (1:4 m/v) composé de 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% déoxycholate de sodium et 1X comprimé de cocktail contenant du EDTA - sans inhibiteur de protéase (Roche, Indianapolis, IN) et centrifugés à 12,000 g pour 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et la concentration des protéines a été déterminée à partir du kit d'essai Bio-Rad (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), avec l'albumine du sérum de bœuf (BSA) comme standard. Par la suite, le surnageant a été resuspendu dans du tampon de Leammi. Afin de comparer l'expression des enzymes dans chacun des deux groupes, témoin et RCIU, une quantité égale de protéines (spécifique à chaque anticorps) a été séparée et migrée sur un gel d'électrophorèse polyacrylamide - dodécylsulfate de sodium (8% pour Flt-1 et Flk-1 - 10% pour PEPCK-C - 12% pour Aldolase B, FBPase et G6Pase). Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de nitrocellulose (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Tous les sites non spécifiques sur cette membrane ont été bloqués avec du lait en poudre 5% dilué dans un tampon phosphate ((PBS, 1.4 M; NaCl, 2.7 mM; KCl, 100 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17.6 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) / 0.1% Tween 20). Pour la détection des protéines, les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec les anticorps anti-Aldolase B (1:1000) de chèvre, anti-FBPase

(1:1000) de lapin, anti-G6Pase (1:1000) de lapin, anti-PEPCK-C (1:1000) de lapin, anti-Flt-1 (1:1000) de lapin, et anti-Flk-1 (1:500) de lapin (tous provenant de Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Les membranes ont été par la suite lavées, et incubées avec l'anticorps secondaire 'horseradish peroxydase' - anti-souris/lapin IgG conjugué (1:5000; Amersham, Buckinghamshire, UK) et l'anticorps 'donkey horseradish peroxydase' - anti-chèvre IgG (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Inc). Afin de bien contrôler la quantité de protéines, les valeurs ont été standardisées avec la  $\beta$ -actine. Ainsi, toutes les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti- $\beta$ -actine de souris (1:100,000; Novus Biologicals Inc., Littleton, CO). Les bandes immunoréactives ont été visualisées à partir du système de détection ECL (GE HealthCare Biosciences Inc., Montréal, Québec, Canada) et quantifiées par Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). Les résultats finaux sont exprimés en unité densitométrique, relative à la  $\beta$ -actine.

## 2.4 ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats obtenus en unité densitométrique ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM (l'écart type de la moyenne). Afin de comparer l'effet du traitement maternel (diète faible en sodium qui conduit à une RCIU) et l'effet du sexe sur l'expression protéique des enzymes étudiées, le test ANOVA à deux facteurs de GraphPad Prism, version 4.03 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) a été utilisé. Ce test indique également s'il y a interaction entre la RCIU et le sexe. Autrement dit, il nous permet de déterminer si l'effet de la RCIU est exprimé différemment entre les mâles et les femelles. Si l'interaction entre la RCIU et le sexe est significative, un test *t* de

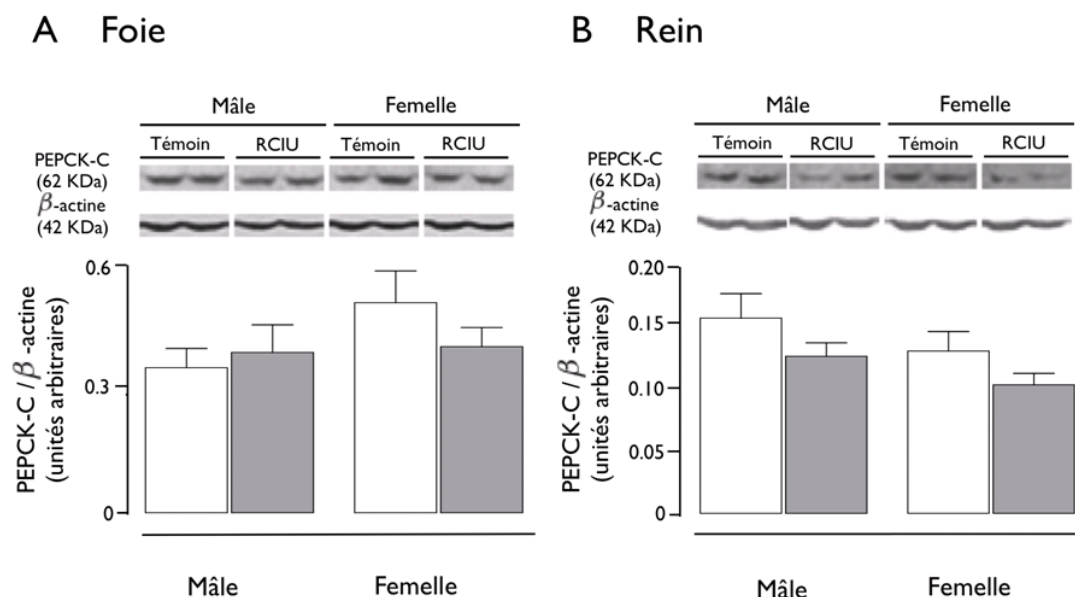
Student est alors effectué pour indiquer plus précisément les différences. On compare donc le groupe mâle témoin à celui femelle témoin et les groupes témoins aux groupes RCIU du même sexe. En absence d'interaction, le post-test (Newman-Keuls à multiple facteurs) est utilisé. Ce test nous permet d'effectuer toutes les possibilités de comparaison qui s'appliquent pour les groupes témoins et RCIU autant chez les mâles que chez les femelles. Le seuil minimal de la signification statistique est assumé par la valeur  $P < 0.05$ .

### 3. RÉSULTATS

### **3.1 ENZYMES DE LA NÉOGLUCOGÉNÈSE HÉPATIQUE ET RÉNALE CHEZ DES FŒTUS TÉMOINS OU RCIU**

Afin de mesurer l'effet de la diminution de perfusion placentaire sur la néoglucogénèse hépatique et rénale, l'expression protéique des enzymes associées à ce métabolisme a été mesurée dans les tissus de fœtus témoins et RCIU de 22 jours. L'expression protéique de la PEPCK cytosolique, enzyme limitante de la voie de néoglucogénèse n'est pas différente entre les foies (Fig. 14A) et les reins (Fig. 14B) provenant d'animaux témoins ou RCIU du même sexe. Aucune différence d'expression n'est observée entre les tissus provenant d'animaux témoins mâles et femelles.

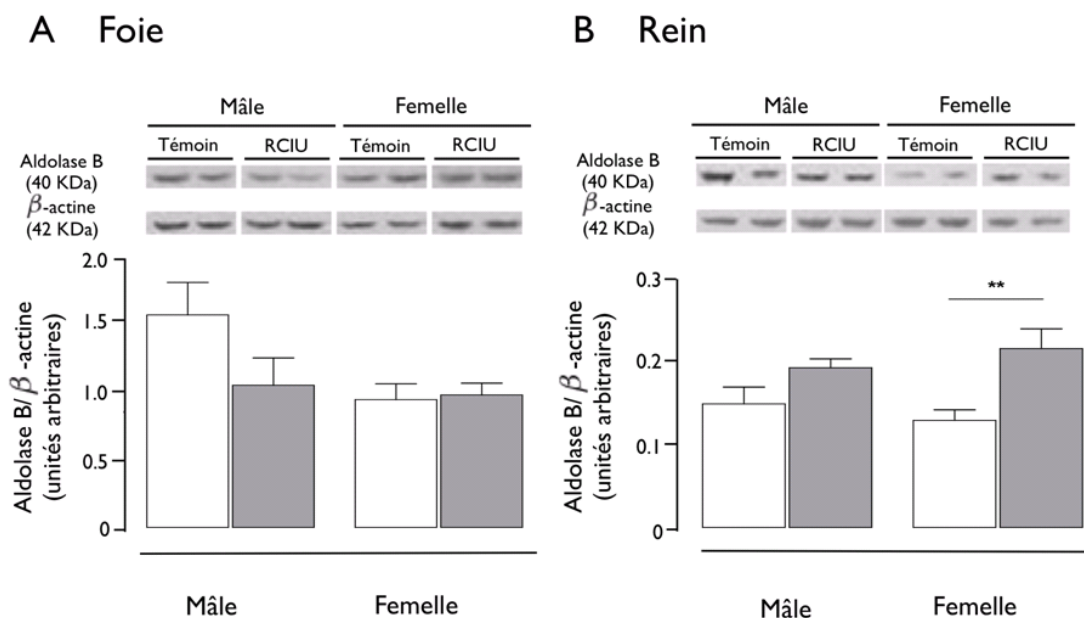




**Figure 14. Expression protéique de la phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C) dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des immunobuvardages représentatifs et des bandes d'analyses densitométriques sont exprimés en unités arbitraires par rapport à la  $\beta$ -actine. Ces bandes d'analyses, affichées sous forme d'histogrammes, représentent la moyenne  $\pm$  SEM des foies (A) ou des reins (B). Les tissus récoltés de chaque fœtus (mâle ou femelle) d'une même portée ont été considérés comme un échantillon provenant du groupe témoin ou RCIU. Un total de 10 portées différentes a été formé pour chaque groupe.

L'expression protéique de l'Aldolase B n'est pas différente entre les foies des fœtus RCIU et de leurs témoins du même sexe tel qu'illustré à la figure 15A. Par contre, une augmentation de l'aldolase B dans les reins fœtaux RCIU par rapport au groupe témoin ( $P < 0.001$ , ANOVA à deux facteurs) est observée, atteignant le seuil de signification chez les femelles RCIU ( $P < 0.01$ , test Newman-Keuls, Fig. 15B).

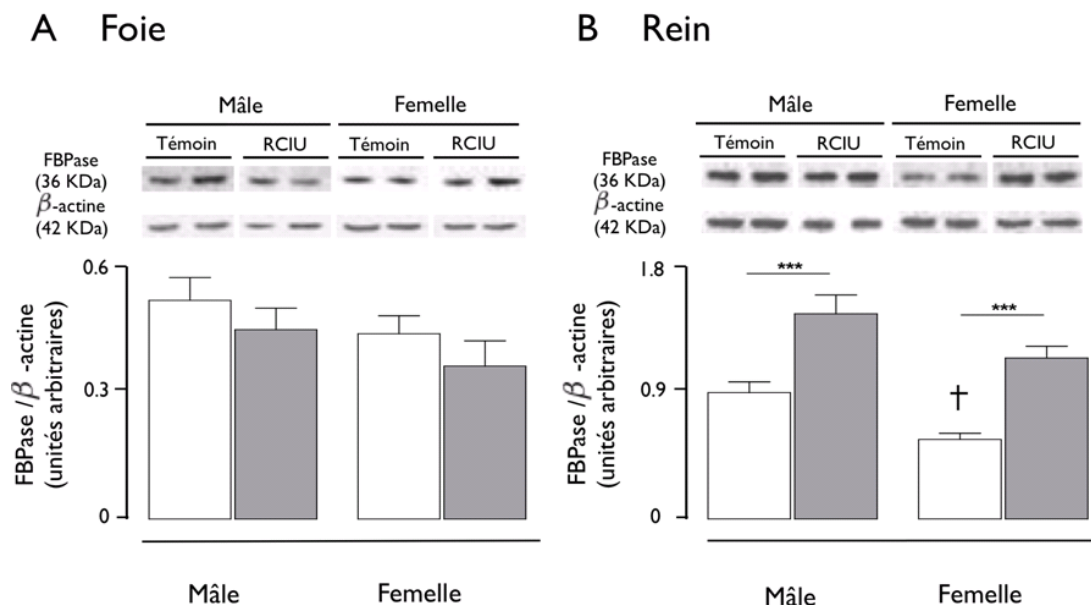


**Figure 15. Expression protéique de l'aldolase B dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des immunobuvardages représentatifs et des bandes d'analyses densitométriques sont exprimés en unités arbitraires par rapport à la  $\beta$ -actine. Ces bandes d'analyses, affichées sous forme d'histogrammes, représentent la moyenne  $\pm$  SEM des foies (A) ou des reins (B). Les tissus récoltés de chaque fœtus (mâle ou femelle) d'une même portée ont été considérés comme un échantillon provenant du groupe témoin ou RCIU. Un total de 10 portées différentes a été formé pour chaque groupe. Le test ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif de l'environnement fœtal sur l'expression rénale de l'aldolase B ( $P < 0.001$ ). \*\* $P < 0.01$  vs témoin du même sexe, test de Newman-Keuls.

L'expression protéique de la FBPase, qui représente l'une des réactions limitantes de cette voie, est inchangée entre les foies provenant des fœtus témoins ou RCIU du même sexe (Fig. 16A.). Cependant, une augmentation significative de l'expression de cette protéine dans les reins fœtaux RCIU par rapport à leurs témoins est notée ( $P < 0.001$ , Newman-Keuls test). De plus, on observe une diminution

d'expression chez les femelles par rapport aux mâles ( $P < 0.01$ , ANOVA à deux facteurs, Fig. 16B).



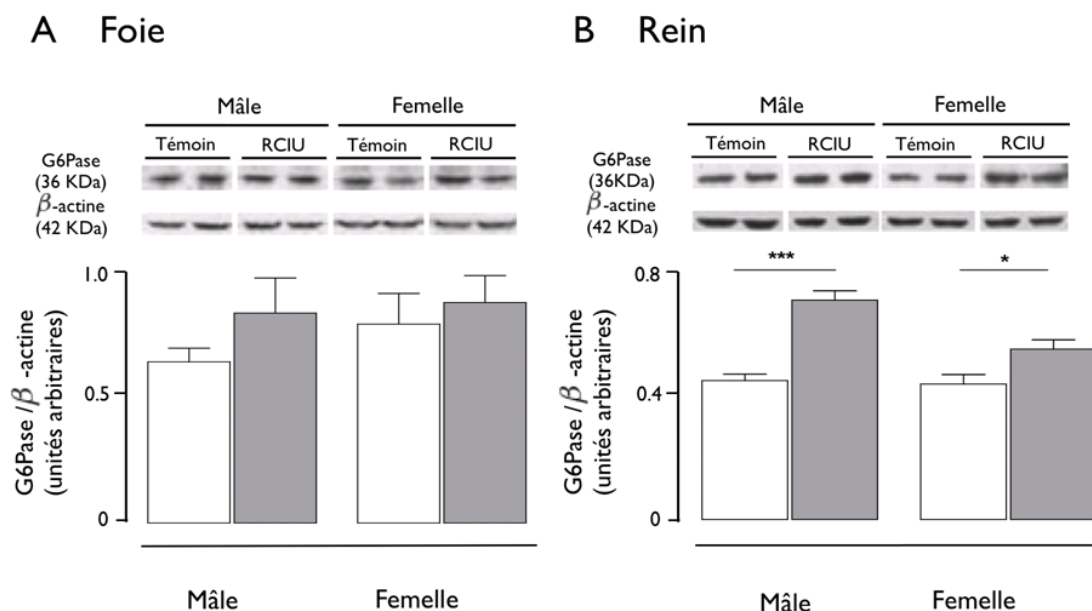
**Figure 16. Expression protéique de la fructose biphosphatase (FBPase) dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des immunobuvardages représentatifs et des bandes d'analyses densitométriques sont exprimés en unités arbitraires par rapport à la  $\beta$ -actine. Ces bandes d'analyses, affichées sous forme d'histogrammes, représentent la moyenne  $\pm$  SEM des foies (A) ou des reins (B). Les tissus récoltés de chaque fœtus (mâle ou femelle) d'une même portée ont été considérés comme un échantillon provenant du groupe témoin ou RCIU. Un total de 10 portées différentes a été formé pour chaque groupe. Le test ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif de l'environnement fœtal ( $P < 0.001$ ) et du sexe ( $P < 0.01$ ) sur l'expression rénale de la FBPase. \*\*\* $P < 0.001$  vs témoin du même sexe, test de Newman-Keuls.

† $P < 0.05$  vs témoin mâle, test de Newman-Keuls.

Bien que l'expression protéique de la G6Pase ne soit pas différente entre les foies des fœtus RCIU et de leurs témoins du même sexe (Fig. 17A), elle est

remarquablement augmentée dans les reins de fœtus RCIU par rapport aux témoins ( $P < 0.001$ , ANOVA à deux facteurs). Une différence de sexe est de même observée, avec un niveau plus élevé chez les mâles ( $P < 0.01$ , ANOVA à deux facteurs, Fig. 17B).



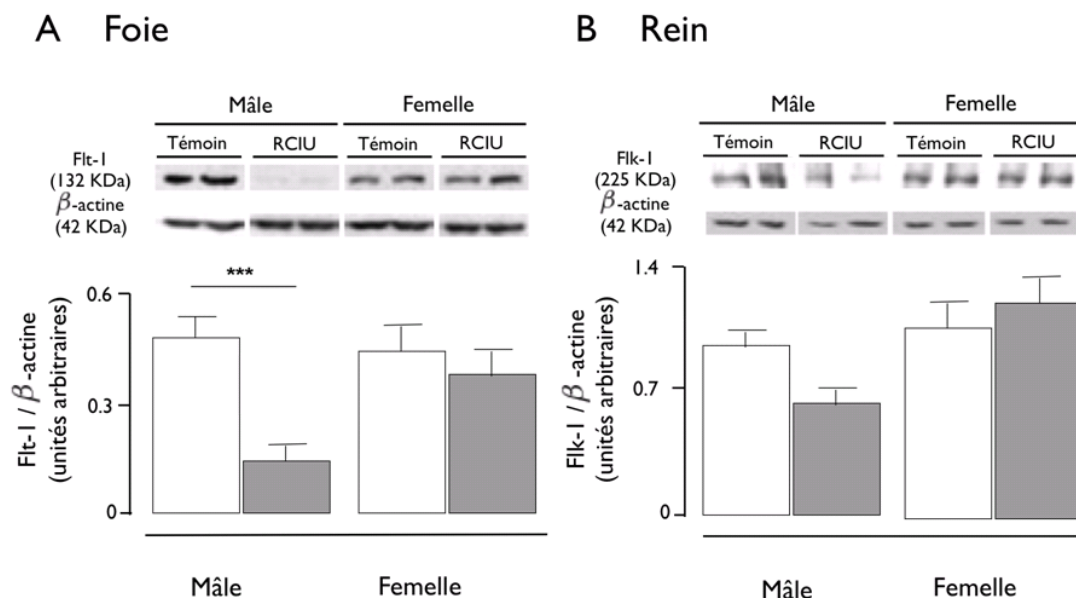
**Figure 17. Expression protéique de la glucose-6-phosphatase (G6Pase) dans le foie (A) et le rein (B) de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des immunobuvardages représentatifs et des bandes d'analyses densitométriques sont exprimés en unités arbitraires par rapport à la β-actine. Ces bandes d'analyses, affichées sous forme d'histogrammes, représentent la moyenne  $\pm$  SEM des foies (A) ou des reins (B). Les tissus récoltés de chaque fœtus (mâle ou femelle) d'une même portée ont été considérés comme un échantillon provenant du groupe témoin ou RCIU. Un total de 10 portées différentes a été formé pour chaque groupe. Le test ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif de l'environnement fœtal ( $P < 0.001$ ) et du sexe ( $P < 0.01$ ), ainsi que la présence d'une interaction entre ces deux facteurs ( $P < 0.05$ ) sur l'expression rénale de la G6Pase.

\* $P < 0.05$  et \*\*\* $P < 0.001$  vs témoin du même sexe, test t Student.

### **3.2 RÉCEPTEURS DU VEGF (FLT-1 ET FLK-1) CHEZ DES FŒTUS TÉMOINS OU RCIU**

Une diminution significative de l'expression protéique de Flt-1 est observée dans les reins de fœtus RCIU par rapport aux témoins ( $P < 0.01$ , ANOVA à deux facteurs, Fig. 18A). Une interaction est notée entre l'effet RCIU et le sexe ( $P < 0.05$ , ANOVA à deux facteurs) et le test t Student a démontré une diminution significative uniquement chez les mâles ( $P < 0.001$ ). Par contre, aucun changement significatif au niveau de l'expression de Flk-1 n'est observé dans les reins fœtaux (Fig. 18B).



**Figure 18. Expression protéique des récepteurs de VEGF, Flt-1 (A) et Flk-1 (B) dans le rein de fœtus de rat de 22 jours.**

Les fœtus témoins sont représentés par les barres claires alors que les RCIU sont les barres foncées. Des immunobuvardages représentatifs et des bandes d'analyses densitométriques sont exprimés en unités arbitraires par rapport à la  $\beta$ -actine. Ces bandes d'analyses densitométriques affichées, représentent la moyenne  $\pm$  SEM des foies ou des reins regroupés en 10 fœtus par groupe. Des cœurs et des foies fœtaux ont été utilisés comme contrôles positifs pour Flt-1 et Flk-1, respectivement. Le test ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif de l'environnement fœtal sur l'expression de Flt-1 ( $P < 0.01$ ) et Flk-1 ( $P < 0.05$ ). De plus, une interaction entre l'environnement fœtal et le sexe ( $P < 0.05$ ) a été observée au niveau de l'expression de Flt-1. \*\*\* $P < 0.001$  vs témoin du même sexe, test t Student.

#### 4. DISCUSSION

Lors d'une diminution de perfusion placentaire, il y a adaptation fœtale pour favoriser la survie, ainsi, certains mécanismes physiologiques et cellulaires se mettent en place. Dans plusieurs cas, une redistribution du débit sanguin vers les organes nobles en dépit du rein survient. Le but principal de ce projet de recherche est de déterminer l'effet du traitement maternel, qui induit une restriction de croissance, sur les enzymes de la néoglucogenèse hépatique et rénale fœtale. Au cours du présent mémoire, à l'aide d'un modèle animal, nous avons démontré une augmentation de l'expression de l'aldolase B, la FBPase et la G6Pase dans les reins des fœtus RCIU comparativement aux témoins. Ceci est d'autant plus intéressant que malgré le rôle crucial du foie pour la production de glucose, aucun changement significatif n'est observé dans ce tissu. Ces résultats nous suggèrent donc que le rein génère le glucose pour subvenir à ses besoins énergétiques requis pour une croissance adéquate. De plus, ce rein fœtal RCIU qui subit une redistribution du flot sanguin au détriment de son développement, démontre une diminution de l'expression protéique de VEGF et de son récepteur Flt-1 pouvant suggérer une atteinte au niveau vasculaire.



#### **4.1 LA NÉOGLUCOGENÈSE HÉPATIQUE ET RÉNALE CHEZ LES FŒTUS RCIU**

Les activités enzymatiques de la PEPCK et de la G6Pase sont augmentées dans le foie de fœtus d'agneau et de rat à partir de la dernière semaine de gestation, suggérant que l'activation de la voie de la néoglucogenèse chez le fœtus fait partie des événements essentiels qui préparent ce dernier à la vie extra-utérine (Fowden, et al. 1998; Kalhan and Parimi 2000). Ces mêmes espèces animales démontrent, en cas d'une insuffisance placentaire induisant la RCIU, une augmentation significative de la néoglucogenèse qui entraîne une production accrue de glucose hépatique comparativement aux animaux témoins (Franko et al. 2009; Limesand, et al. 2007).

Dans le modèle RCIU utilisé dans le laboratoire, aucun changement significatif n'a été observé pour la PEPCK-C, l'Aldolase B, la FBPase et la G6Pase dans les foies fœtaux. Cette discordance avec certaines études pourrait s'expliquer par les aspects qui diffèrent entre plusieurs modèles de RCIU, que ce soit dans la différence des diètes administrées aux animaux ou dans la procédure qui induit la restriction de croissance (ligature des artères inférieures utérines, hypoxie, insuffisance placentaire ou autres). Une augmentation de la néoglucogenèse hépatique chez les fœtus RCIU s'associe plus souvent à une baisse du taux de glucose (hypoglycémie), une diminution d'oxygène (hypoxie), ou même une redistribution de flot sanguin au détriment du foie. En réponse à cette action, le métabolisme énergétique, incluant la néoglucogenèse hépatique, s'élève chez le fœtus RCIU (Franko et al. 2009; Thorn, et al. 2009). Cependant, ces symptômes ne sont pas présents chez le modèle RCIU induit par une diète faible en sodium.

Le rein utilise principalement la néoglucogénèse pour la production de glucose et ce dernier en synthétise selon ses besoins énergétiques et la disponibilité des substrats (Guder and Ross 1984; Schoolwerth et al. 1988). Nos résultats démontrent que l'expression protéique de l'Aldolase B, la FBPase et la G6Pase sont significativement augmentées dans les reins de fœtus RCIU. Puisque la FBPase est une enzyme limitante et irréversible et que la G6Pase est la réaction finale qui forme le glucose, cela suggère une augmentation de la néoglucogénèse rénale chez les fœtus RCIU comparativement aux témoins. Des résultats similaires ont été observés chez le rat adulte ayant eu des diètes faibles en glucose et fortes en protéines (Pillot, et al. 2009). Cette étude a démontré qu'une nutrition riche en protéines stimule de façon drastique l'expression des gènes régulateurs de la néoglucogénèse rénale (G6Pase et PEPCK) après trois jours, sans toutefois activer la synthèse de glucose dans le foie.

La surrénale, située au pôle supérieur du rein, est entourée d'une capsule adipeuse et d'une couche très vascularisée du tissu conjonctif rénal. Plus précisément, le cortex surrénalien subit une invasion artérielle et veineuse provenant de l'artère phrénique inférieure, de l'aorte et des artères rénales d'où le lien étroit entre la surrénale et le rein (Insel and Snavely 1981). Plusieurs stéroïdes sécrétés par la surrénale dans le plasma interagissent via des récepteurs nucléaires pour assurer plusieurs fonctions rénales. Par exemple, l'aldostérone, qui est produite par la zone glomérulée de la cortico-surrénale, contrôle l'équilibre vasculaire des électrolytes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et de l'eau au niveau des cellules du tubule distal du néphron (Rossier 2010). De plus, ces deux organes sont intimement liés dans le métabolisme du cortisol. La surrénale produit le cortisol (métabolite actif sur les récepteurs des minéralocorticoïdes

et des glucocorticoïdes) alors que le rein métabolise ce dernier en cortisone (métabolite inactif) (Seckl and Walker 2001). Également, plusieurs études ont démontré que l'administration de la noradrénaline dans des tubules isolés de cortex rénal de rat augmentent significativement la production de glucose (Cersosimo et al. 1999; Kessar and Saggerson 1980; Meyer, et al. 2002). Ce mécanisme fonctionne par l'intermédiaire du récepteur  $\alpha$ -1-adrénocepteur. En bloquant ce dernier par un antagoniste (thymoxamine) au niveau des tubules corticaux du néphron, l'effet stimulateur de la noradrénaline sur les enzymes de la néoglucogénèse est totalement réduit (Kessar and Saggerson 1980; Kurokawa and Massry 1973). Ces études ont clairement confirmé que les catécholamines stimulent directement la néoglucogénèse rénale. Tout récemment, notre laboratoire a démontré l'augmentation de la sécrétion des catécholamines dans les surrénales de fœtus RCIU (Bibeau et al. 2010). Cette augmentation de la production des catécholamines par la médulo-surrénale pourrait expliquer l'expression élevée des enzymes de la néoglucogénèse dans les reins fœtaux du modèle RCIU.

Toutes ces observations suggèrent que la voie métabolique est significativement altérée lors du développement rénal chez un fœtus ayant subi une RCIU. Il est probable que le fœtus doit compenser le déficit de nutriments et assurer au mieux son équilibre énergétique. Néanmoins, dans le laboratoire, le glucose sérique a été dosé chez les mères et les fœtus témoins et RCIU (Bibeau et Brochu, résultats non publiés). Il a été démontré que les niveaux de glycémie ne sont pas différents entre les mères recevant la diète normale ou la diète faible en sodium et entre les fœtus RCIU et les témoins. Si la néoglucogénèse hépatique n'est pas modifiée et le glucose est normal, le fœtus ne souffre probablement pas d'une hypoglycémie. Alors, le rein, qui subit une

redistribution du débit cardiaque favorisant l'irrigation des organes nobles (cœur et cerveau), pourrait être dans le besoin de synthétiser du glucose afin d'assurer sa propre stabilité énergétique. Tel que mentionné précédemment, le développement du rein chez le rat débute au 12<sup>ème</sup> jour de la gestation jusqu'au 18<sup>e</sup> jour (maturation) après la naissance. Durant la période prénatale, le glucose joue un rôle de carburant énergétique important dans les structures et les fonctions intracellulaires, incluant les cellules des tubules rénaux (Hay et al. 1981). Cela pourrait donc expliquer l'augmentation de la néoglucogenèse rénale dans les fœtus RCIU. Les cellules du tubule proximal qui sont en prolifération continue et subissent des différenciations cellulaires consomment énormément de glucose pour leurs besoins énergétiques (Larsson 1975). L'ATP qui provient de la phosphorylation oxydative mitochondriale, dont le glucose est la source principale, demeure essentiel pour la croissance rénale (Wijkhuisen, et al. 1997). Une étude sur des cultures de cellules hépatiques de souris a démontré que l'énergie fournie par le glucose demeure essentielle pour la prolifération, la migration et la structure micro-anatomique des différentes cellules en culture (Norlund, et al. 1987). Ainsi, la redistribution du flot sanguin au détriment du rein prive ce dernier d'un apport suffisant de glucose. En réponse, une adaptation pourrait s'installer par une néoglucogenèse rénale élevée afin de rétablir le statut énergétique requis pour la morphogenèse rénale (la formation des segments du néphron et la structure des glomérules) (Bauer, et al. 2002; Schreuder, et al. 2005).

La fonction rénale, incluant la filtration glomérulaire et la réabsorption des nutriments par le tubule proximal, est fonctionnelle durant la vie fœtale chez le rat (McCrorry 1972). Les transporteurs de glucose sont déjà actifs pendant la dernière

semaine de gestation (Macheda, et al. 2002; Werner, et al. 1989). Il est bien démontré encore que la réabsorption active du glucose, dépendant du sodium, se développe dans les tubules proximaux du rein entre la 18<sup>ème</sup> et la 22<sup>ème</sup> semaine de grossesse chez l'humain (Iioka, et al. 1987). La présence d'une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase au niveau de la membrane basolatérale des cellules du tubule proximal permet de rétablir, par l'hydrolyse de l'ATP, l'équilibre électrochimique des ions du sodium entre le milieu intracellulaire et extracellulaire (Mandel 1986). Le glucose est la source d'énergie (ATP) préférée pour la réabsorption sodique et plus précisément pour l'activation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Ross, et al. 1986). Il a été démontré que, dans les tubules proximaux de fœtus de rat, la phosphorylation oxydative mitochondriale joue un rôle crucial dans la production d'ATP afin d'activer la pompe ATPase et assurer une réabsorption sodique adéquate (Wijkhuisen et al. 1997). Nous proposons un mécanisme similaire dans le modèle de rat RCIU (diète faible en sodium), où une altération au niveau de la réabsorption de sodium dans le tubule proximal pourrait aussi stimuler la néoglucogénèse rénale pour activer la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et rétablir l'équilibre sodique. En effet, une diminution du sodium plasmatique est observée chez le fœtus RCIU (Bibeau et al. 2010). De plus, il a été démontré dans notre laboratoire une augmentation significative de l'expression génique des sous-unités  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de la sous-unité  $\alpha_1$  dans les reins de fœtus RCIU (Gagnon et Brochu, informations personnelles).

Plusieurs modifications dans le métabolisme du glucose ont été aussi identifiées par criblage génique et validées par RT-PCR en mesurant l'expression génique d'enzymes associées à la voie des glucides (PEPCK, cytochrome b5) (résultats non

publiés). Le cytochrome b5, une protéine membranaire située au niveau du réticulum endoplasmique, est impliqué dans les réactions d'oxydoréduction (transport d'électrons) et joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des acides gras (Laethem, et al. 1993; Vergeres and Waskell 1995).

Tous ces résultats obtenus dans le laboratoire s'accordent avec mes travaux pour soutenir une altération au niveau de la néoglucogénèse rénale chez le fœtus ayant subi une RCIU.

Dans les résultats obtenus, on remarque une augmentation plus marquée de la FBPase et de la G6Pase chez les mâles RCIU alors que l'expression de l'aldolase B est augmentée de façon significative chez les femelles RCIU. Cela indique que l'expression protéique des enzymes étudiées est modulée par le sexe. Plusieurs travaux ont démontré la présence d'un pic de la testostérone autour du 18<sup>e</sup> jour chez les fœtus de rats (Baum, et al. 1991; Corbier, et al. 1992). On pense que ce changement hormonal peut imposer une différence avec les femelles et jouer un rôle important dans le développement de maladies cardiovasculaires ou de conditions pathologiques rénales à la suite d'une RCIU (Baserga, et al. 2009; Li, et al. 2008; Ojeda, et al. 2007). Toutefois, dans notre étude, il est encore difficile de tirer des conclusions en ce qui a trait à l'effet du sexe sur les mécanismes moléculaires qui se mettent en place chez le fœtus lors d'une RCIU.

## 4.2 VEGF ET RÉCEPTEURS FLT-1 ET FLK-1 LORS D'UNE RCIU

Le VEGF est un facteur de croissance crucial pour l'angiogenèse durant la formation de l'embryon (Claesson-Welsh 2003; Ferrara et al. 2003). Il est impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales, la formation des capillaires et la prolifération de l'épithélium tubulaire (Tufro et al. 1999). L'expression du VEGF dans les reins fœtaux RCIU est contrôlée par une variété de stimuli telle que l'hypoxie, le stress et d'autres facteurs de croissance ou cytokines (El Awad, et al. 2000; Forsythe, et al. 1996; Takahashi and Shibuya 2005).

Nos résultats démontrent une diminution significative de l'expression protéique du VEGF et de son récepteur Flt-1 dans les reins de fœtus RCIU vs témoins. Un résultat semblable a été observé chez des rats (Sprague-Dawley) dont la RCIU est induite par une ligature des artères inférieures utérines. La diminution significative de VEGF a été confirmée dans les reins fœtaux, autant chez les mâles que les femelles (Baserga et al. 2009).

Dans la surrénale de fœtus femelle du présent modèle RCIU, l'expression de quatre gènes (Igfbp1 (protéine liante du facteur de croissance à l'insuline; *insulin-like growth factor binding protein 1*); Trf (transferrine), récepteur de reconnaissance du signal, sous-unité  $\beta$ ; Aldolase A; céruloplasmine) est augmentée par rapport aux surrénales des animaux témoins (Bibeau et al. 2010). Cette élévation est souvent observée en présence d'hypoxie (Martin, et al. 2005; Tazuke, et al. 1998). Fréquemment en clinique, lorsqu'il y a hypoxie chez les fœtus RCIU, il existe une redistribution du flot sanguin du rein vers les organes nobles (cœur, cerveau) (Block, et al. 1984; Jensen and Berger 1991). Ainsi, lors d'une RCIU induite par une insuffisance

placentaire, cette redistribution du débit cardiaque entraîne plusieurs altérations au niveau du rein: diminution de la filtration glomérulaire et baisse de la production de l'urine chez le fœtus (Arduini and Rizzo 1991). Ces modifications sont l'une des causes majeures qui augmentent les risques d'hypertension ou d'autres conditions pathologiques rénales à l'âge adulte (Barker 1998; Ojeda et al. 2008; Woodall, et al. 1996). Effectivement, les animaux du modèle RCIU utilisé dans ce mémoire ont démontré à 12 semaines de vie, une diminution significative de la filtration glomérulaire, ce qui suggère la présence d'une dysfonction rénale (Battista et al. 2002).

### **4.3 LES LIMITES EXPÉRIMENTALES**

Nous travaillons avec une souche de rats (Sprague-Dawley) non consanguine apportant à notre étude une grande variabilité génétique semblable à l'humain. Nos échantillons reflètent donc l'hétérogénéité génique de la population, ce qui est un aspect positif de l'utilisation de cette souche. Bien que plusieurs distinctions s'imposent entre le rat et l'humain concernant les paramètres externes (mode de vie, nutrition), la plupart des modifications cellulaires et physiologiques dans ce contexte ne peuvent être étudiées que chez l'animal, en particulier le rat. Ainsi, l'environnement expérimental (température, rythme circadien, etc.) bien contrôlé et la durée de gestation chez le rat sont les éléments principaux qui se distinguent de la femme enceinte. La diète faible en sodium est uniquement un outil qui provoque la diminution des échanges fœto-maternels et mène à des effets indésirables observés chez les bébés RCIU. Cette approche nous permet donc de découvrir des pistes de recherche qui nous



aideront à la compréhension de la programmation fœtale, et finir par trouver des conclusions logiques qui s'appliquent à la recherche clinique.

Le rein est un organe complexe, composé du cortex et de la zone médullaire. Chaque région a une fonction spécifique et la néoglucogenèse est localisée au niveau des cellules corticales du tubule proximal. Lors du prélèvement des tissus, il aurait été plus avantageux de récupérer les cellules proximales des reins fœtaux, plutôt que des reins totaux, pour avoir une meilleure estimation de l'effet désiré. Cependant, cette procédure est techniquement impossible chez les fœtus. Les manipulations qui consistent à mesurer l'expression génique par qRT-PCR et protéique par buvardage de type Western constituent des incertitudes expérimentales (i.e. contaminations d'ADN dans un milieu non traité avec la RNase-free Dnase ou contaminations des solutions par des bactéries) parfois non négligeables et qui demandent de la prudence. Toutefois en contrôlant bien le nombre d'échantillons, les quantités de protéines et en évitant toutes contaminations, nous avons tenté de diminuer ces incertitudes au maximum afin de mieux comparer nos groupes.

D'autres analyses supplémentaires devraient être effectuées, par exemple l'activité des enzymes de la néoglucogenèse. Celle-ci est une mesure du fonctionnement métabolique dans le rein de fœtus RCIU. Une telle approche sera effectuée par l'incorporation des réactifs NADH ou ATP à partir d'un matériel d'essais enzymatiques permettant d'activer les différentes enzymes et mesurer leurs capacités réactionnelles dans les tubules proximaux du rein fœtal chez le rat (Forhead, et al. 2003; Fowden et al. 1993). Cette méthode nous permettra de confirmer les résultats de

l'expression protéique des enzymes de la néoglucogenèse obtenue dans les reins de fœtus RCIU.

#### **4.4 PERSPECTIVES**

Notre étude a démontré une augmentation de la néoglucogenèse dans le rein du fœtus RCIU. Cette voie, qui est essentielle pour la survie du fœtus, est possiblement responsable de certaines conséquences pathologiques à l'âge adulte. Jusqu'à maintenant, plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires restent à être élucidés chez le fœtus et l'adulte, afin de clarifier le lien qui existe entre l'environnement intra-utérin et les maladies survenant à long terme. La plupart des études qui se concentrent sur le métabolisme des glucides ont suivi toute leur attention sur le foie. Néanmoins, nous sommes les premiers à examiner la néoglucogenèse rénale dans un contexte de RCIU, d'où l'originalité de notre travail. Il est bien démontré que les fœtus ayant eu une RCIU sont plus susceptibles d'être atteints de plusieurs maladies, telles que l'hypertension, l'obésité ou le diabète de type 2 (Barker 1997). On a déjà démontré l'existence d'un ratio du rein sur le poids corporel altéré, associé à une dysfonction rénale à l'âge adulte (rats de 12 semaines). Notre travail actuel consiste à identifier un changement dans la voie métabolique qui s'installe dans les reins fœtaux lors d'une RCIU et qui pourrait avoir des effets néfastes à long terme.

Dans le futur, le projet pourrait être complété en exploitant d'autres voies ou mécanismes énergétiques. On pense que la diète faible en sodium peut causer des modifications au niveau de la réabsorption sodique, plus précisément des récepteurs actifs du glucose dépendant du sodium. Ainsi, l'expression d'une série de gènes (qRT-

PCR) sera mesurée pour valider de façon plus précise l'effet de la RCIU sur la réabsorption de glucose au niveau du tubule proximal. Les transporteurs de glucose *sgl1* et *sgl2*, *glut1* et *glut2* pourront donc être mesurés. Dans le modèle utilisé, le sodium plasmatique est diminué chez les fœtus (Bibeau et al. 2010). Comme la réabsorption de glucose par *sgl1* et *sgl2* s'effectue en suivant le gradient de sodium, on pense que l'expression de ces gènes est donc altérée et ces modifications peuvent être associées à la disponibilité du glucose dans les cellules du tubule proximal.

Lors d'un déficit en nutriment, il a été démontré que des facteurs de transcription tels que le PGC-1 $\alpha$  (Récepteur alpha au facteur activé de prolifération des Peroxysomes; *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1alpha*), le YY1 (Facteur de transcription yin-yang; *yin-yang transcription factor 1*), le (ERR) $\alpha$  (Récepteur associé au récepteur des œstrogènes; *estrogen receptor related protein*), la CYTOC (Cytochrome C oxydase; *cytochrome C oxidase*) et le SIRT-1 (sirtuine-1; *silent mating type information regulation 2 homolog*) sont activés (Thorn et al. 2009), ceux-ci pourraient être mesurés. Ces facteurs de transcription peuvent donc être l'origine du signal clé pour la production du glucose qui assurera la régulation métabolique à partir de la néoglucogenèse ou même de l'oxydation des acides gras.

Une diminution de l'expression du VEGF et de son récepteur Flt-1 a été observée. D'autres mécanismes cellulaires doivent être élucidés pour mieux comprendre l'effet de la diminution de perfusion placentaire sur la vascularisation rénale chez les fœtus. Le EET (acide époxyéicosatriénoïque; *epoxyeicosatrienoic acid*), provenant de l'acide arachidonique, est un facteur angiogénique stimulé par une série de facteurs de transcription; CREB (élément de réponse liant l'AMPc; *cAMP response*

*element-binding*) et FOXO1 (*Forkhead box O1*), suivant la voie de signalisation MAPK (Protéine kinase activée par des agents mitogènes) ou AMPc. (Adénosine monophosphate cyclique). Des études chez le rat ont démontré que l'inhibition de la sEH (Hydrolase de l'époxyde soluble; *soluble epoxide hydrolase*), l'enzyme qui convertit le EET (actif) en DHET (Acide dihydroxyéicosatriénoïque; *dihydroxyeicosatrienoic acid*) (inactif), améliore la fonction vasculaire rénale et protège le rein contre les dommages causés par l'hypertension (Zhao, et al. 2004). On pourrait donc étudier cette enzyme dans les reins fœtaux RCIU et vérifier son expression en réponse à la redistribution du flot sanguin en dépit de leur développement.

Après les études d'expression génique, des mesures protéiques et des essais enzymatiques pourront être effectués pour chacun des gènes cibles, ce qui permettra d'élaborer plusieurs pistes très intéressantes à exploiter. Tous ces travaux aideront à une meilleure compréhension des mécanismes rénaux se mis en place lors d'une diminution de l'expansion volémique au cours de la gestation conduisant à une RCIU. À long terme, ces études permettront d'entrevoir des avenues pour mieux identifier les approches de prévention et de traitement lors d'une naissance à la suite d'une RCIU.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P 2007 Chimie et biosynthèse cellulaires. Chapter 2 in *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 4<sup>th</sup> edition, pp.107-110. Paris, quai Panhard et Levassor (Médecine-Sciences).

Arduini D & Rizzo G 1991 Fetal renal artery velocity waveforms and amniotic fluid volume in growth-retarded and post-term fetuses. *Obstet Gynecol* **77** 370-373.

Armitage JA, Taylor PD & Poston L 2005 Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* **565** 3-8.

Barker DJ 1997 Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* **13** 807-813.

Barker DJ 1998 In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* **95** 115-128.

Barker DJ 2007 The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* **261** 412-417.

Barthel A & Schmoll D 2003 Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285** E685-692.

Baserga M, Bares AL, Hale MA, Callaway CW, McKnight RA, Lane PH & Lane RH 2009 Uteroplacental insufficiency affects kidney VEGF expression in a model of IUGR with compensatory glomerular hypertrophy and hypertension. *Early Hum Dev* **85** 361-367.

Battezzati A, Caumo A, Fattorini A, Sereni LP, Coppa J, Romito R, Ammatuna M, Regalia E, Mazzaferro V & Luzi L 2002 Amino acid kinetics during the anhepatic phase of liver transplantation. *Diabetes* **51** 1690-1698.

Battista MC, Oligny LL, St-Louis J & Brochu M 2002 Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283** E124-131.

Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S & Zwiener U 2002 Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand* **176** 83-90.

Baum MJ, Woutersen PJ & Slob AK 1991 Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females. *Biol Reprod* **44** 747-751.

- Bedard S, Sicotte B, St-Louis J & Brochu M 2005 Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* **562** 937-950.
- Bertorello AM & Katz AI 1993 Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol* **265** F743-755.
- Bibeau K, Battista MC, Houde V & Brochu M 2010 Fetal adrenal gland alterations in a rat model of adverse intrauterine environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Block BS, Llanos AJ & Creasy RK 1984 Responses of the growth-retarded fetus to acute hypoxemia. *Am J Obstet Gynecol* **148** 878-885.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, et al. 1996 Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380** 435-439.
- Cersosimo E, Garlick P & Ferretti J 1999 Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia in humans. *Diabetes* **48** 261-266.
- Cherrington AD 1999 Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* **48** 1198-1214.
- Claesson-Welsh L 2003 Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* **31** 20-24.
- Clarson LH, Glazier JD, Sides MK & Sibley CP 1997 Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAR) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* **18** 333-339.
- Coelho R, Wells J, Symth J, Semple R, O'Rahilly S, Eaton S & Hussain K 2007 Severe hypoinsulinaemic hypoglycaemia in a premature infant associated with poor weight gain and reduced adipose tissue. *Horm Res* **68** 91-98.
- Corbier P, Edwards DA & Roffi J 1992 The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* **100** 127-131.
- Cottrell EC & Ozanne SE 2008 Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav* **94** 17-28.
- Cox BE, Word RA & Rosenfeld CR 1996 Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 49-58.

Cramer S, Beveridge M, Kilberg M & Novak D 2002 Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am J Physiol Cell Physiol* **282** C153-160.

Daniel H & Rubio-Aliaga I 2003 An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **284** F885-892.

Dotsch J & Plank C 2009 [Intrauterine growth restriction and renal function--a long-term problem?]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* **49** 8-12.

Dowell RT & Kauer CD 1997 Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **19** 613-625.

Drury DR, Wick AN, Mac KE, Hillyard N, Fitch R, Blackwell ME, Bancroft RW & Dorough ME 1950 Formation of glucose by the kidney. *Am J Physiol* **163** 655-661.

Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Schouten HJ & Peeters LL 1995 Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* **85** 361-367.

Dworkin LD and Brenner BM 2004 The renal circulation. Chapter 7 in Brenner BM, *The kidney*, 7<sup>th</sup> edition, Philadelphia, Saunders.

El Awad B, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Burgel T, Metzen E, Fandrey J & Jelkmann W 2000 Hypoxia and interleukin-1 $\beta$  stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* **58** 43-50.

Ericsson A, Hamark B, Powell TL & Jansson T 2005 Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* **20** 521-530.

Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J 2003 The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9** 669-676.

Forhead AJ, Poore KR, Mapstone J & Fowden AL 2003 Developmental regulation of hepatic and renal gluconeogenic enzymes by thyroid hormones in fetal sheep during late gestation. *J Physiol* **548** 941-947.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD & Semenza GL 1996 Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16** 4604-4613.

Fowden AL, Mijovic J, Ousey JC, McGladdery A & Silver M 1992 The development of gluconeogenic enzymes in the liver and kidney of fetal and newborn foals. *J Dev Physiol* **18** 137-142.

- Fowden AL, Mijovic J & Silver M 1993 The effects of cortisol on hepatic and renal gluconeogenic enzyme activities in the sheep fetus during late gestation. *J Endocrinol* **137** 213-222.
- Fowden AL, Mundy L & Silver M 1998 Developmental regulation of glucogenesis in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol* **508** ( Pt 3) 937-947.
- Franco KL, Forhead AJ & Fowden AL 2009 Effects of maternal dietary manipulation during different periods of pregnancy on hepatic glucogenic capacity in fetal and pregnant rats near term. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19** 555-562.
- Garnica AD & Chan WY 1996 The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr* **15** 206-222.
- Gentili S, Morrison JL & McMillen IC 2009 Intrauterine growth restriction and differential patterns of hepatic growth and expression of IGF1, PCK2, and HSDL1 mRNA in the sheep fetus in late gestation. *Biol Reprod* **80** 1121-1127.
- Georgiades P, Ferguson-Smith AC & Burton GJ 2002 Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23** 3-19.
- Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ & Stumvoll M 2001 Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24** 382-391.
- Girard C 2007 Institut de la statistique du Québec : Le bilan démographique du Québec, Édition 2007. [www.stat.gouv.qc.ca/publications/demograp/pdf2007/Bilan2007.pdf](http://www.stat.gouv.qc.ca/publications/demograp/pdf2007/Bilan2007.pdf)
- Godlewski G, Gaubert-Cristol R, Rouy S & Prudhomme M 1997 Liver development in the rat during the embryonic period (Carnegie stages 15-23). *Acta Anat (Basel)* **160** 172-178.
- Gougoux A, 2005 Circulation rénale. Chapter 4 in *Physiologie des reins et des liquides corporels*, pp 77-82. Édition MultiMondes inc.
- Guder WG & Ross BD 1984 Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* **26** 101-111.
- Gyamfi D. and Patel V 2009 Liver metabolism: Biochemical and molecular regulations. Chapter 1 in Preedy V.R., Lakshman R., Srirajaskanthan R., Watson R.R., *Nutrition, Diet therapy, and the liver*, USA, Taylor and Francis group.
- Hanson RW & Reshef L 1997 Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* **66** 581-611.



Hay WW, Jr., Sparks JW, Quissell BJ, Battaglia FC & Meschia G 1981 Simultaneous measurements of umbilical uptake, fetal utilization rate, and fetal turnover rate of glucose. *Am J Physiol* **240** E662-668.

Hediger MA & Rhoads DB 1994 Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev* **74** 993-1026.

Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P & Ramos P 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* **27** 2499-2519.

Hung GC, Brown CR, Wolfe AB, Liu J & Chiang HL 2004 Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J Biol Chem* **279** 49138-49150.

Iioka H, Moriyama I, Itoh K, Hino K, Okamura Y, Itani Y, Kato Y, Ibaragi T & Ichijo M 1987 [D-glucose reabsorption activity of fetal kidney (by using brush border membrane vesicles of proximal tubule)]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **39** 1037-1041.

Insel PA & Snavely MD 1981 Catecholamines and the kidney: receptors and renal function. *Annu Rev Physiol* **43** 625-636.

Jensen A & Berger R 1991 Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J Dev Physiol* **16** 181-207.

Joseph SE, Heaton N, Potter D, Pernet A, Umpleby MA & Amiel SA 2000 Renal glucose production compensates for the liver during the anhepatic phase of liver transplantation. *Diabetes* **49** 450-456.

Joslin E.P. and Kahn C.R. (2005). Hormone action and the regulation of metabolism. Chapter 8 in *Joslin's diabetes mellitus*, 14<sup>th</sup> edition, pp. 129-131.

Kalhan S & Parimi P 2000 Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* **24** 94-106.

Kepka A, Szajda SD & Zwierz K 2008 [Fructose-1,6-bisphosphatase--marker of damage to proximal renal tubules]. *Pol Merkur Lekarski* **24** 125-130.

Kessar P & Saggerson ED 1980 Evidence that catecholamines stimulate renal gluconeogenesis through an alpha 1-type of adrenoceptor. *Biochem J* **190** 119-123.

Kevorkova O, Ethier-Chiasson M & Lafond J 2007 Differential expression of glucose transporters in rabbit placenta: effect of hypercholesterolemia in dams. *Biol Reprod* **76** 487-495.

Krebs HA & Yoshida T 1963 Renal Gluconeogenesis. 2. The Gluconeogenic Capacity of the Kidney Cortex of Various Species. *Biochem J* **89** 398-400.

Kriz W. and Kaissling B 2000 Structural organization of the mammalian kidney Chapter 23 in Seldin DW, Giebish G., *The kidney: Physiology and Pathophysiology*, 3<sup>th</sup> edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.

Kurokawa K & Massry SG 1973 Evidence for stimulation of renal gluconeogenesis by catecholamines. *J Clin Invest* **52** 961-964.

Laethem RM, Balazy M, Falck JR, Laethem CL & Koop DR 1993 Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem* **268** 12912-12918.

Langley SC & Jackson AA 1994 Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* **86** 217-222; discussion 121.

Larsson L 1975 The ultrastructure of the developing proximal tubule in the rat kidney. *J Ultrastruct Res* **51** 119-139.

Latini G, De Mitri B, Del Vecchio A, Chitano G, De Felice C & Zetterstrom R 2004 Foetal growth of kidneys, liver and spleen in intrauterine growth restriction: "programming" causing "metabolic syndrome" in adult age. *Acta Paediatr* **93** 1635-1639.

Lechner MS & Dressler GR 1997 The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech Dev* **62** 105-120.

Lee YJ & Han HJ 2007 Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl* S27-35.

Lenton K 2002 VEGFR-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Regul Homeost Agents* **16** 227-232.

Li S, Chen SC, Shlipak M, Bakris G, McCullough PA, Sowers J, Stevens L, Jurkowitz C, McFarlane S, Norris K, et al. 2008 Low birth weight is associated with chronic kidney disease only in men. *Kidney Int* **73** 637-642.

Limesand SW, Rozance PJ, Smith D & Hay WW, Jr. 2007 Increased insulin sensitivity and maintenance of glucose utilization rates in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293** E1716-1725.

Longo LD 1983 Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* **245** R720-729.

Macheda ML, Kelly DJ, Best JD & Rogers S 2002 Expression during rat fetal development of GLUT12--a member of the class III hexose transporter family. *Anat Embryol (Berl)* **205** 441-452.

Mandel LJ 1986 Primary active sodium transport, oxygen consumption, and ATP: coupling and regulation. *Kidney Int* **29** 3-9.

Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Troger J, Barth S, Camenisch G, et al. 2005 Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* **105** 4613-4619.

Martin-Gronert MS & Ozanne SE 2007 Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med* **261** 437-452.

McCrory WW 1972 Developmental Nephrology. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 7.

Meyer C, Dostou JM, Welle SL & Gerich JE 2002 Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282** E419-427.

Moutquin JM, Bilodeau R, Raynault P, Amyot G, Blair JF, Labelle L, Rainville C & Gagnon L 1982 [Prospective study of arterial pressure during pregnancy. Prediction of hypertensive complications]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **11** 833-837.

Mullis PE & Tonella P 2008 Regulation of fetal growth: consequences and impact of being born small. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22** 173-190.

Nordlie RC, Foster JD & Lange AJ 1999 Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* **19** 379-406.

Norlund R, Norlund L & Taljedal IB 1987 Morphogenetic effects of glucose on mouse islet-cell re-aggregation in culture. *Med Biol* **65** 209-216.

Ojeda NB, Grigore D & Alexander BT 2008 Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **15** 101-106.

Ojeda NB, Grigore D, Yanes LL, Iliescu R, Robertson EB, Zhang H & Alexander BT 2007 Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292** R758-763.

Osol G & Cipolla M 1993 Interaction of myogenic and adrenergic mechanisms in isolated, pressurized uterine radial arteries from late-pregnant and nonpregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* **168** 697-705.

Osol G & Mandala M 2009 Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)* **24** 58-71.

Pallone TL, Zhang Z & Rhinehart K 2003 Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* **284** F253-266.

Palmer SK, Zamudio S, Coffin C, Parker S, Stamm E & Moore LG 1992 Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. *Obstet Gynecol* **80** 1000-1006.

Penhoet EE & Rutter WJ 1975 Detection and isolation of mammalian fructose-diphosphate aldolases. *Methods Enzymol* **42** 240-249.

Persson E & Jansson T 1992 Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol Scand* **145** 195-196.

Petersen KF, Price T, Cline GW, Rothman DL & Shulman GI 1996 Contribution of net hepatic glycogenolysis to glucose production during the early postprandial period. *Am J Physiol* **270** E186-191.

Pillot B, Soty M, Gautier-Stein A, Zitoun C & Mithieux G 2009 Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* **150** 616-624.

Platz E & Newman R 2008 Diagnosis of IUGR: traditional biometry. *Semin Perinatol* **32** 140-147.

Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iynedjian PB & Mithieux G 2007 Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* **127** 555-565.

Ross BD, Espinal J & Silva P 1986 Glucose metabolism in renal tubular function. *Kidney Int* **29** 54-67.

Rossier 2010 BC Hypertension finds a new rhythm. *Nat Med* **16** 27-28.

Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J & Brochu M 1999 Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* **180** 608-613.

Sadler TW 2006 Digestive system. Chapter 14 in *Langman's Medical Embryology*, 10th Edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.

Saez DE & Slebe JC 2000 Subcellular localization of aldolase B. *J Cell Biochem* **78** 62-72.

Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL & Rosso P 2006 Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* **47** 203-208.

Schoolwerth AC, Smith BC & Culpepper RM 1988 Renal gluconeogenesis. *Miner Electrolyte Metab* **14** 347-361.

Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA & Delemarre-van de Waal HA 2005 Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* **16** 2913-2919.

Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Ross L.M., and Lamperti E 2006 Abdomen and Pelvis. Chapter 2 in *Thieme atlas of anatomy: Neck and internal organs*, pp. 227-229.

Scott PA, Provencher M, Guerin P & St-Louis J 2009 Gestation-induced uterine vascular remodeling. *Methods Mol Biol* **550** 103-123.

Seckl JR & Walker BR 2001 Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* **142** 1371-1376.

Simon M, Grone HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W & Fuchs E 1995 Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol* **268** F240-250.

Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, Nadkarni V & Gerich JE 1997 Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia* **40** 749-757.

Takahashi H & Shibuya M 2005 The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **109** 227-241.

Takata K & Hirano H 1997 Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. *Microsc Res Tech* **38** 145-152.

Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O & Hirano H 1994 Immunolocalization of glucose transporter GLUT1 in the rat placental barrier: possible role of GLUT1 and the gap junction in the transport of glucose across the placental barrier. *Cell Tissue Res* **276** 411-418.

Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ & Giudice LC 1998 Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 10188-10193.

Thompson JN 2007 Fetal nutrition and adult hypertension, diabetes, obesity, and coronary artery disease. *Neonatal Netw* **26** 235-240.

Thorn SR, Regnault TR, Brown LD, Rozance PJ, Keng J, Roper M, Wilkening RB, Hay WW, Jr. & Friedman JE 2009 Intrauterine growth restriction increases fetal hepatic gluconeogenic capacity and reduces mRNA translation initiation and nutrient sensing in fetal liver and skeletal muscle. *Endocrinology*.

Torgersen KL & Curran CA 2006 A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* **29** 2-19.

Tortora GJ 1999 Development during pregnancy. In John Wiley: *Principles of human anatomy*, 9<sup>th</sup> edition, New York.

Tufro A, Norwood VF, Carey RM & Gomez RA 1999 Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* **10** 2125-2134.

Vergeres G & Waskell L 1995 Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77** 604-620.

Vidricaire G & Tremblay MJ 2004 [For a better understanding of the mechanisms involved in vertical transmission of HIV]. *Med Sci (Paris)* **20** 784-787.

Werner H, Adamo M, Lowe WL, Jr., Roberts CT, Jr. & LeRoith D 1989 Developmental regulation of rat brain/Hep G2 glucose transporter gene expression. *Mol Endocrinol* **3** 273-279.

Wijkhuisen A, Djouadi F, Vilar J, Merlet-Benichou C & Bastin J 1997 Birth-related changes in energy metabolism enzymes and Na-K-ATPase in kidney proximal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* **272** C787-793.

Wood IS & Trayhurn P 2003 Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89** 3-9.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH & Gluckman PD 1996 Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* **40** 438-443.

Wooding FB, Fowden AL, Bell AW, Ehrhardt RA, Limesand SW & Hay WW 2005 Localisation of glucose transport in the ruminant placenta: implications for sequential use of transporter isoforms. *Placenta* **26** 626-640.

Yanez AJ, Ludwig HC, Bertinat R, Spichiger C, Gatica R, Berlien G, Leon O, Brito M, Concha, II & Slebe JC 2005 Different involvement for aldolase isoenzymes in kidney glucose metabolism: aldolase B but not aldolase A colocalizes and forms a complex with FBPase. *J Cell Physiol* **202** 743-753.

Zhao X, Yamamoto T, Newman JW, Kim IH, Watanabe T, Hammock BD, Stewart J, Pollock JS, Pollock DM & Imig JD 2004 Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. *J Am Soc Nephrol* **15** 1244-1253.

Zorzoli A, Turkenkopf IJ & Mueller VL 1969 Gluconeogenesis in developing rat kidney cortex. *Biochem J* **111** 181-185.